



Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Herbario MERF "Dr. Luis Enrique Ruiz Terán"
Instituto de Investigaciones
"Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro"



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS HOJAS DE *Ternstroemia acrodanthe* Kobuski & Steyerf.

www.bdigital.ula.ve

Autora:
Br. Leysi Martínez

Tutor:
Profe. Pablo Meléndez

Cotutora:
Profa. Alida Pérez

Mérida, enero de 2024

Este trabajo lo dedico, primeramente, a Dios que con su manto protector siempre ha cuidado de mí, no me ha dejado caer y me ha permitido estar donde estoy.

A mi madre Deecy que con su amor incondicional han sido el mayor apoyo y con su conducta ejemplar me ha hecho una persona de bien.

A mi padre Manuel, que, aunque hoy no estás aquí con nosotras, dejo un gran legado, donde estés sé que estas orgulloso.

A mis hermanas, Mariela y Marisela que con su amor fraternal han estado conmigo en momentos buenos y malos.

A mis sobrinos, Lisandro y Clara que con sus risas y travesuras me han dado alegría.

A mi hija Sofía que ha sido el mayor regalo que la vida me ha dado, con su amor y comprensión me ha acompañado durante este largo transitar.

A mis tías, Zonia y Yonelis, por su gran amor y comprensión en todo momento, dándome siempre aliento para seguir

A mi amigo Américo que siempre me apoyó en este largo camino, cuando más necesite me brindo su mano amiga.

Para ellos, este trabajo.

Leysi Martínez

Agradecimientos

Primeramente, agradezco a Dios y a mis padres porque ellos son mi pilar fundamental en todo.

A la Universidad de Los Andes que es mi segunda casa y que siempre me ha dado las mayores alegrías en mi vida académica. Siempre me sentiré agradecida y orgullosa de ser Ulandina.

A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por permitirme cumplir mi sueño de formarme como Licenciada en Bioanálisis junto a los mejores profesores, técnicos y compañeros.

Al Instituto de Investigaciones por haberme permitido realizar esta investigación en sus instalaciones.

A mi tutor Prof. Pablo Meléndez, le agradezco por haberme dado el privilegio de ser su tesista y por todo el amor, dedicación y compromiso que tuvo para con este trabajo. Sin sus conocimientos, tiempo y esfuerzo este trabajo no sería lo que es.

A la jurado y cotutora Profa. Alida Pérez, por su colaboración en la realización de esta investigación, enriqueciéndola con todos sus conocimientos.

A la jurado Profa. Thayded Villasmil, por su colaboración en esta investigación para mejorarla y enriquecerla.

A la Profa. Yndra y Profa. Rosa Aparicio, por toda la colaboración brindada en este trabajo.

Al Dr. José Grande, por haberme iniciado en este trabajo, por todo el conocimiento que me pudo aportar y por haber sido anfitrión en este trabajo de investigación.

Al Prof. Luis Rojas, excelente persona y profesor. Agradecida por todo el apoyo que recibí y por haberme abierto las puertas en el Instituto de Investigaciones.

Al Prof. Luis Gámez de la Facultad de forestal por el gran apoyo que me brindo para la finalización de este trabajo.

A los Profesores que durante toda la carrera dieron su mejor esfuerzo y me permitieron obtener los conocimientos que fueron indispensables para llevar a cabo este trabajo.

A mis compañeros y amigos que me han brindado su apoyo no solo académicamente, sino emocionalmente con su amistad y cariño.

A todos, ¡GRACIAS!

Índices de contenido

	Pág
Índices de figuras	x
Índices de tablas	xi
Resumen	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	3
- Planteamiento del problema	3
- Justificación de la investigación	5
- Objetivos de la investigación	7
- Alcances y limitaciones de la investigación	8
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	9
- Trabajos previos	9
- Antecedentes históricos	12
- Familia Ternstroemiaceae	12
- Género <i>Ternstroemia</i>	13
- <i>Ternstroemia acrodantha</i>	15
- Bases teóricas	17
- Productos naturales	17
Fenoles	17
Quinonas	18
Cumarinas	19
Flavonoides	20
Antocianinas	21
Taninos	22
Alcaloides	23
Esteroles	23
Triterpenos	24

Índices de contenido (continuación)

Saponinas	25
- Tamizaje fitoquímico	26
Ensayo de reconocimiento de alcaloides	26
Ensayo de reconocimiento de compuestos fenólicos	27
Ensayo de reconocimiento de terpenoides	29
Ensayo de reconocimiento de saponinas	29
- Extractos vegetales	30
Por arrastre de vapor	30
Calentamiento por vapor	30
Fluidos súpercrítico	30
Extracción sólido-líquido	30
Maceración	31
Infusión	31
- Bacterias	32
- Antibióticos	33
Clasificación	33
Betalactámicos	34
Cefalosporinas	35
Carbapenemos	35
Monobactámicos	35
Polipéptidos	35
Amino glucósidos	36
Tetraciclinas	36
Glicilclinas	36
Oxazolidonas	36
Macrólidos	36

Índices de contenido (continuación)

Clindamicinas	37
Estreptomicinas	37
Quinolonas	37
Rifampicina	38
Sulfonamidas	38
- Mecanismo de acción de los antibióticos	38
- Resistencia bacteriana	40
Mecanismo de resistencia de las bacterias Gram positivas	42
Resistencia a betalactamasas tipo penicilinasas	42
Modificación de la PBP (gen mecA)	42
Modificación de la PBO1a, PBP2b, PBP2x	42
Modificación a nivel ribosomal (gen erm)	42
Resistencia a alto nivel a la gentamicina	43
Mecanismo de resistencia de las bacterias Gram negativas	43
Betalactamasas resistentes a los inhibidores (IRT)	43
Betalactamasas tipo AMPC	43
Betalactamasas de espectro extenso (BLEE	44
Betalactamasas tipo carbapenemasa	44
- Métodos para determinar la actividad antibacteriana	44
Método de difusión	45
Dilución y micro-dilución en caldo	45
Difusión en agar o Kirby Bauer	46
- Definición operacional de términos	47
Escala de turbidez de MacFarland	47
Efecto bactericida	47
Efecto bacteriostático	47

Índices de contenido (continuación)

Coloración de Gram	47
Reacciones colorimétricas	47
Definición operacional de las variables	48
- Hipótesis	51
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	52
Tipo de investigación	52
Diseño de la investigación	52
Población y muestra	52
Instrumento de recolección de datos	53
- Procedimiento de la investigación	54
Recolección del material vegetal	54
Preparación de los extractos vegetales	55
- Tamizaje fitoquímico	56
- Evaluación de la actividad antibacteriana	57
Preparación de las muestras	57
Microorganismos evaluados	57
Activación o enriquecimiento de las cepas bacterianas	58
Preparación de agar Mueller-Hinton	58
Preparación de las placas	58
Preparación de los inóculos	58
Método de difusión en disco Kirby-Bauer	58
Lectura de los resultados	59
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
Estudio fitoquímicos de los extractos de las hojas de <i>T. acrodanthe</i>	60
Actividad antibacteriana de las hojas de <i>T. acrodanthe</i>	63

Índices de contenido (continuación)

CAPÍTULO V	66
CONCLUSIONES	66
RECOMENDACIONES	67
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	68
Índices de Figuras	x
Figura 1. Flavonoides del Género <i>Ternstroemia</i>	15
Figura 2. Hojas de la especie <i>Ternstroemia acrodantha</i>	16
Figura 3. Ejemplos de fenoles	18
Figura 4. Estructura de una orto-benzoquinona	19
Figura 5. Estructura de una cumarina	19
Figura 6. Estructura de una flavona	21
Figura 7. Estructura de una antocianina	21
Figura 8. Estructura de un tanino	22
Figura 9. Estructura de un alcaloide	23
Figura 10. Estructura de un esteroide	24
Figura 11. Estructura de un triterpeno	24
Figura 12. Estructura de una saponina	25
Figura 13. Reacción que explica la formación de compuestos insolubles entre un alcaloide y una sal metal pesado	27
Figura 14. Reacción de formación de complejos coloreados de un compuesto fenólico con una sal de hierro III	28
Figura 15. Sistema benzopiranos	28
Figura 16. Voucher de <i>T. acrodantha</i>	54
Figura 17. Recolección, secado y molido de las partes aéreas de <i>T. acrodantha</i>	55

Índices de contenido (continuación)

Figura 18. Maceración y filtración de los extractos de las hojas de <i>T. acrodanthe</i>	55
Figura 19. Resultado del análisis fitoquímico de los extractos de las hojas de <i>T. acrodanthe</i> .	61
Figura 20. Resultado de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de <i>T. acrodanthe</i> .	64
Índices de Tablas	xi
Tabla 1. Definición operacional de la variable dependiente: Actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de <i>T. acrodanthe</i> .	49
Tabla 2. Definición operacional de la variable dependiente : Actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de <i>T. acrodanthe</i>	50
Tabla 3. Microorganismo evaluados	57
Tabla 4. Análisis fitoquímico de los extractos de las hojas de <i>T. acrodanthe</i>	60
Tabla 5. Resultado de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de <i>T. acrodanthe</i>	63



Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Herbario MERF “Dr. Luis Enrique Ruiz Terán
Instituto de Investigaciones
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS
HOJAS DE *Ternstroemia acrodantha* Kobuski & Steyerm.
Mérida – Venezuela
Trabajo de Grado**

Realizado por:
Br. Leysi Martínez
Tutor: Dr. Pablo Meléndez
Cotutora: Dra. Alida Pérez

RESUMEN

Ternstroemia acrodantha Kobuski & Steyerm. pertenece al orden Ericales, su familia Ternstroemiaceae y su género *Ternstroemia*; esta especie es endémica de la cordillera Andina del estado Mérida-Venezuela, donde la especie se localiza en zonas húmedas entre los 2.200 y 2600 m.s.n.m. Las hojas de *Ternstroemia acrodantha* fueron recolectadas en San Eusebio, Municipio Andrés Bello. Para la obtención de los extractos de las hojas se empleó el método de reflujo con los solventes de hexano y etanol; la identificación de los compuestos químicos se determinó a través del análisis fitoquímico, aplicando las técnicas de color y/o precipitación, por lo que se identificó la presencia de esteroides por la técnica de Liebermann-Burchard y los compuestos fenólicos mediante la prueba con cloruro de hierro. Para la actividad antibacteriana se empleó el método de difusión de disco en agar (Kirby Bauer), con bacterias de referencia internacional ATCC y la aplicación del extracto etanólico de las hojas, en el cual se presencié actividad antibacteriana en las cepas de *Staphylococcus aureus* (7mm), *Enterococcus faecalis* (9mm), *Klebsiella pneumoniae* (12 mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (8mm). Por lo que en el presente estudio se confirma que los extractos de las hojas de *T. acrodantha* tiene relación con la actividad antibacteriana y se establece los primeros metabolitos secundarios de esta especie, que no había sido estudiada a nivel químico ni biológico.

Palabras claves: *Ternstroemia*, actividad antibacteriana, metabolitos secundarios, inhibición bacteriana.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de las propiedades curativas de las plantas fue meramente instintivo; el hombre primitivo encontró en ellas el alimento y la medicina; se percató de sus propiedades apoyándose también en la observación de los animales que las ingerían (Vivot y Sánchez, 2012). Es por ello que se ha definido la medicina tradicional como la suma de todos los conocimientos teóricos y prácticos, los cuales han sido utilizados para el diagnóstico, prevención y supresión de enfermedades físicos o mentales, (Albornoz, 2001).

Los seres vivos sintetizan una gran variedad de compuestos que se definen como metabolitos secundarios, en la mayoría de los casos no tienen utilidad aparente para el ser que lo sintetiza, a diferencia de los metabolitos primarios, que presentan una utilidad definida. Las plantas elaboran una gran diversidad de productos químicos, los cuales usan principalmente como mecanismo de defensa, sin embargo, el hombre puede aprovechar estas propiedades para su beneficio, encontrando en los recursos naturales la solución a diferentes problemáticas, permitiendo el descubrimiento de diferentes productos, entre ellos los antibacterianos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Entender y controlar la constante de emergencia de cepas bacterianas refractarias a uno o más antibacterianos, es uno de los mayores retos de la comunidad científico-médica a nivel nacional e internacional. De hecho es un problema creciente de salud pública a nivel mundial (OMS, 2001). La resistencia a los antibióticos, incluida la resistencia a múltiples antibacterianos, está aumentando entre muchas bacterias en los centros de atención de salud (Uchil, Singh y Vijay 2014).

En respuesta a la necesidad de conseguir alternativas eficaces para el control de las infecciones bacterianas, se ha recurrido a la fitoquímica logrando encontrar nuevas moléculas activas (Ávila, Baquero, Vina y Murillo. 2005). Así, a pesar del avance alcanzado por la síntesis química, se ha podido encontrar que las plantas son fuentes valiosas de sustancias activas con propiedades antibacterianas (Nacimiento, Locatelli, Freitas, Silva. 2000).

En tal sentido, en la presente investigación se determinó la composición química y la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Ternstroemia acrodanthe* Kobuski & Steyererm.

De este modo, el presente trabajo esta sistematizado en correspondencia con las normas de la Asociación Americana de Psicología (siglas en Ingles APA) de la siguiente manera: El Capítulo I, denominado El Problema, consta de los siguientes subtítulos: Planteamiento del problema, Justificación, Objetivos de la investigación, tanto general como específicos, Alcances y Limitaciones de la investigación. El Capítulo II, denominado Marco Teórico, contiene los siguientes elementos: Trabajos previos, Antecedentes históricos, Bases teóricas, Definición operacional de términos, Operacionalización de las variables e Hipótesis. El Capítulo III, denominado Marco Metodológico, comprende: Tipo de investigación, Diseño de la investigación, Población y muestra, Sistema de variables, Metodología de la investigación y Diseño de análisis. El Capítulo IV, se refiere a Resultados y Discusiones. El Capítulo V, se encuentra las Conclusiones y Recomendaciones obtenidas con el desarrollo de la investigación en relación al logro de los objetivos planteados. Posteriormente se reflejan las Referencias Bibliohemerográficas.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

Las bacterias han evolucionado compartiendo su información genética entre ellas, por lo que existe una interacción recíproca entre el hospedador y el huésped; esta población recibe el nombre de microbiota habitual y forma una barrera de protección frente a agentes patógenos (Virgin. 2007). La presencia y desarrollo de estos microorganismos se denomina colonización y no tiene importancia clínica ni detección de respuesta inmune en el organismo, sin embargo, pueden producir infección cuando disminuye el sistema inmune (Jarvis. 1996). La resistencia a los antibacterianos a expuesto la eficacia en cuanto la prevención y tratamiento de una gran variedad de infecciones que cada vez aumenta a causa de la resistencia bacteriana, esta se produce cuando los microorganismo sufren cambios al verse expuesto a los antibióticos y como resultados los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten, lo que incrementa el riesgo de propagación (Moreno, González y Beltrán. 2009).

Debido a la gran incidencia, algunos autores han sugerido nuevas alternativas terapéuticas, tomando en cuenta las propiedades que conforman los extractos de las plantas; como posibles tratamientos que permitan combatir la resistencia bacteriana (Kofogoue, Tchinda, Mbaveng y Kuete. 2022).

En vista a la problemática presentada, se formuló la siguiente interrogante. ¿Cuál es la relación entre la composición química de los extractos de las hojas de *Ternstroemia acrodanthe* y su actividad antibacteriana?, siendo que *T. acrodanthe* hasta la actualidad no se ha

establecido sus composición química, ni actividades biológicas, por eso la razón de estudio de esta especie.

www.bdigital.ula.ve

Justificación de la investigación

Las plantas medicinales han sido utilizadas como materia prima para la producción de extractos o para el aislamiento de sustancias puras, son merecedoras de un interés creciente en países industrializados y representan el 80 % del arsenal terapéutico en los países en desarrollo. Entre las razones que justifican el interés creciente por las plantas medicinales silvestres, en los países industrializados, se pueden citar: la falta de nuevos descubrimientos por los procesos tradicionales de la síntesis química, de moléculas farmacológicamente activas y de posible uso terapéutico, los efectos secundarios producto del uso correcto o abusivo de algunos fármacos sintéticos y el cambio de perfil del consumidor que, desde finales de la década de 1980, están prefiriendo los productos naturales, en todos los segmentos del mercado, abarcando de esta manera los sectores de salud, alimentación, vestuario o higiene (Sharapin. 2000).

Uno de los aspectos importantes en la investigación con plantas medicinales es la disminución en el costo de la terapia medicamentosa, el alcance de los pueblos de diferentes conocimientos prácticos para el tratamiento con plantas a un costo mínimo y en armonía con la tradición popular de ciertas afecciones corrientes (Germosén-Robineau. 1996).

En tal sentido, diversos estudios fitoquímicos de la familia han reportado que produce diversos metabolitos secundarios como cumarinas, esteroides, terpenos, taninos, flavonoides, polifenoles (Moreno y cols. 2013; Kofogoue y cols. 2022), así mismo, en la especie *T. cameronensis* del mismo, donde se ha evidenciado actividad antibacteriana, por lo que se planteó el estudio de composición química de los extractos de las hojas de *Ternstroemia acrodanthe* y la determinación de la actividad antibacteriana sobre cepas de referencia

internacional, siendo el primer análisis fitoquímico y actividad antibacteriana para la especie en estudio.

www.bdigital.ula.ve

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos de las hojas de *Ternstroemia acrodanthe*.

Objetivos específicos

Obtener los extractos de hexano y etanol de las hojas de *T. acrodanthe* mediante la técnica de eflujo.

Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios en los extractos previamente obtenidos a través de pruebas de coloración y/o precipitación.

Determinar la actividad antibacteriana de los extractos de *T. acrodanthe* por el método de difusión de disco en agar (Kirby Bauer).

Alcances y limitaciones de la investigación

Alcances de la investigación

Con esta investigación se estableció el primer reporte sobre la actividad antibacteriana y composición química de los extractos de las hojas de *T. acrodantha*, proporcionando información importante para futuras investigaciones y contribuyendo con el conocimiento científico de esta planta.

Limitaciones de la investigación

En relación a las limitaciones de la investigación se presentaron los siguientes inconvenientes:

Alto costo de los reactivos, agar y materiales necesarios para el análisis fitoquímico y determinación de la actividad antibacteriana.

Fallas eléctricas, escases de agua y la interrupción del servicio de internet, que interrumpieron en varias oportunidades el desarrollo de la parte experimental y elaboración del manuscrito.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos previos

Kofogoue, Tchinda, Mbaveng y Kuete (2022), realizaron estudio en *Trenstroemia cameronensis* R. Letouzet en Camerún, el objetivo fue estudiar la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas, frutos, corteza de las especies seleccionadas; utilizaron como método para el análisis fitoquímico, técnicas cualitativas. La concentración de los extractos de metanol evaluada para la determinación química y actividad antibacteriana fue: hojas (1024 ug/mL), corteza (512 ug/mL) y frutos (512 ug/mL); en su estudio, determinaron la presencia de polifenoles, taninos, triterpenos, esteroides y flavonoides en las hojas; polifenoles, flavonoides, antraquinonas, antocianinas y saponinas en la corteza; flavonoides y saponinas en los frutos. Los autores también realizaron la actividad antibacteriana de los extractos de metanol empleando el método de pozo de Kirby-Bauer frente a seis cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia stuartii*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, la actividad potenciadora de antibióticos fue evaluado frente a 12 tipos de antibióticos entre ellos, eritromicina, gentamicina, ofloxacina, ciprofloxacina, flucoxacilina, cloranfenicol, tetraciclina, azitromicina, doxiciclina, kanamicina, tianfenicol y cloxacilina. Reportaron que, en el extracto metanol de las hojas presentó un halo de inhibición de 16mm y en el extracto metanol de la corteza un halo de 8mm corteza por lo que se presenció que estos extractos tuvieron actividad potenciadora de antibióticos en *P. aeruginosa*; y la actividad antibacteriana de los extractos (hojas, corteza y frutos) expreso actividad moderada contra *E. coli* con un halo de 4 mm en *E. aerogenes* mostró un halo de 8 mm y *S. aureus*

manifestó un halo de inhibición de 12 mm. Por lo que los autores concluyen que, los extractos metanólicos de *T. cameronensis* presentó diversos metabolitos secundarios así como actividad antibacteriana, por lo esta investigación coincide con el presente trabajo, debido a que ambas evalúan la actividad antibacteriana y el análisis fitoquímico de los extractos de las hojas de una especie del género *Ternstroemia*.

Raju, Shintu, Reddell y Munch (2022), realizaron aislamiento y caracterización de un compuesto denominado Ternstroenol: F en la especie vegetal perteneciente a *Ternstroemia cherryi* (R.M. Bailey) Merr en Australia. Los frutos fueron sometidos a por el sistema de extracción con sohlex, donde obtuvieron 28 g del extracto de alcohol etílico, el cual fue llevado a sequedad completa. Para la determinación del compuesto ternstroenol F, fue resuspendido el extracto de alcohol etílico con alcohol metílico y posteriormente utilizaron la técnica de cromatografía en columna, teniendo como resultado la identificación del metabolito ternstroenol F. La especie estudiada por dichos autores se relaciona con *T. acrodanthe* por pertenecer al mismo género, por lo que pudiera estar presente este metabolito en los extractos de las hojas de *T. acrodanthe*

Soto (2019), reportó el perfil metabólico de *Ternstroemia pringlei* (F.M.Baley) Merr en México, determinando la diferencia entre el contenido de los metabolitos de las colectas bimestrales de las hojas y flores. Para la obtención de los perfiles bioquímicos, comenzaron recolectando las muestras entre los meses de diciembre, febrero, abril y junio, de las hojas en la etapa de floración, posterior a eso recogió muestras de capullos florales en diciembre, flores recién abiertas en febrero y flores en senescencia en el mes de abril posteriormente obtiene los extractos de metanol en las hojas y flores de la especie y determinan los metabolitos por el método de resonancia magnética nuclear (RMN-1H) con una concentración de 0,05ppm. En el

extracto de las hojas se evidenció la presencia de triterpenos, aminoácidos y ácidos grasos, mientras que en las flores se identificó un bifenilpropanoide (katsumadina). Los resultados obtenidos durante los meses de diciembre, febrero, abril y junio, mostraron que hubo variación en la concentración de los compuestos químicos; por lo que Soto concluyó que dependiendo de los meses y condiciones ambientales los metabolitos podían variar su concentración o incluso podían estar ausentes en determinadas circunstancias, Los compuestos bioquímicos hallados por Soto podrían estar presentes en los extractos de las hojas de *Ternstroemia acrodantha*.

www.bdigital.ula.ve

Antecedentes Históricos

La familia Ternstroemiaceae fue estudiada por primera vez por el micólogo Pyrame de Candolle y la dividió en tres tribus, en 1824 este mismo autor agregó 2 tribus más a la familia (Luna y Ochoterana, 2004). Esta familia fue previamente clasificada en el orden de las Guttiferales (Bentham y Hooker, 1862); (Bessey, 1915), años más tarde se clasificó en el orden Parietales (Lawrence, 1951) y Theales (Cronquist, 1981). Las clasificaciones más actuales es el orden Ericales (Moreno, 2013). De acuerdo a un estudio filogenético realizado por Luna y col, 2004), esta familia comprende 20 géneros (*Adinandra*, *Anneslea*, *Archboldiodendron*, *Balthasaria*, *Camellia*, *Cleyera*, *Eurya*, *Freziera*, *Gordonia*, *Pyrenaria*, *Schima*, *Stewartia*, *Symplocarpon*, *Ternstroemia*, *Visnea*, *Apterosperma*, *Dankia*, *Euryodendron*, *Ficalhoa* y *Sladenia*) y alrededor de 700 especies, que se distribuyen principalmente en regiones tropicales o subtropicales de ambos hemisferios, con algunos géneros distribuidos en áreas templadas del este de América del Norte y Asia.

Familia Ternstroemiaceae

Dentro de la familia se encuentran algunas especies en México como son *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standley, *Ternstroemia sylvatica* Schltdl. & Cham, *Ternstroemia tepezapote* Schltdl. & Cham y *Ternstroemia oocarpa* (Rose) Melch; a lo largo de Centro América hasta Perú, Brasil y Bolivia, los aborígenes la utilizaban como anti inflamatorio y tradicionalmente han sido empleadas en infusiones para aliviar trastornos nerviosos para tratar dolores reumáticos, estímulos a la cicatrización según el contenido de sus principios activos a presentado actividad antiinflamatoria, así como también presenta una

importante actividad antioxidante ya que incrementa las defensas antioxidantes naturales del organismo y actúa como captadores de radicales libres (Moreno, 2013); presentan actividad antimicrobiana contra de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* (Kofogoue y cols, 2022). Su composición química descrita por algunos autores, reportan que esta familia presentan alcaloides, polifenoles, flavonoides catequinas, terpenos, cumarinas y esteroides (Moreno y col, 2013).

Género *Ternstroemia*

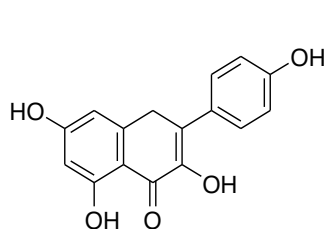
El género *Ternstroemia* fue propuesto por primera vez en 1781 por José Celestino Mutis en el Supplementum Plantarum, este género es sumamente heterogéneo y por el momento no es posible determinar una característica que defina la condición monofilética de este taxón, que desde su circunscripción ha tenido muchos nombres de acuerdo al sistema de clasificación empleado; Taonabo es el primer nombre dado a este género y fue utilizado por muchos botánicos de Norteamérica que seguían la norma de prioridad que dicta el código de nomenclatura estadounidense. Sin embargo, el congreso del Código Internacional de Nomenclatura Botánica (CINB) ha adoptado el nombre de *Ternstroemia* (Clarence, 1942).

Ternstroemia es el género más extendido de la familia Ternstroemiaceae, con especies distribuidas en ambos hemisferios; este género comprende alrededor de 243 especies de árboles y arbustos perennifolios; en zonas tropicales de América y Asia se distribuyen alrededor de 85 especies, principalmente en Centroamérica y 10 de ellas se encuentran en México; las especies del género *Ternstroemia* se han caracterizado por el fuerte y agradable aroma que desprenden sus flores, utilizadas comúnmente en

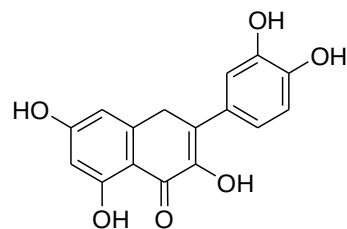
infusiones para calmar los nervios debido sus propiedades relajantes (Guzmán, Reyes, Bonilla. 2014). Las flores también son utilizadas para ayudar a disminuir el insomnio y el miedo (Fernández, 1987). Los frutos se usan tradicionalmente para aliviar problemas de ansiedad, trastornos del sueño y convulsiones, por otra parte, las hojas frescas son utilizadas en la zona montañosa central de Veracruz en forma de cataplasmas para desinflamar golpes (Cano, 1997).

El género *Ternstroemia* ha sido objeto de estudio desde finales de los años 70, en el que se reportó por primera vez la presencia de cuatro metabolitos de tipo triterpeno en *Ternstroemia japónica* Carl Peter: ácido oleanólico, primulagenina, dihidropriverogenina y A1-barrigenol (Yosioka, 1978), estudios fitoquímicos posteriores permitieron aislar de los frutos de esta especie nuevas saponinas denominadas ternstroemiósidos y bidesmosídico, además, se ha reportado 3 benzoquinonas (jacaranona, 3-hidroxi-2,3-dihidrojacaranona y 3-metoxi-2,3-dihidrojacaranona) y un derivado del ácido oleanólico y del ácido ursólico (Jo, Suh, Shin, Jung y Im, 2005).

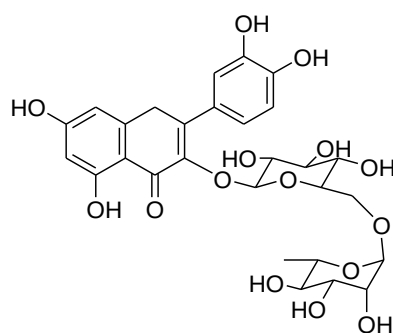
Con respecto a estudios fitoquímicos de las hojas se han aislado una serie de metabolitos denominados fenil etanoides glucosilados, los cuales se derivan del ácido benzoico y se caracterizan estructuralmente por contener un hidroxifeniletil ligado a una β -D-glucopiranososa, que a su vez puede estar unido a otras moléculas de azúcar (glucosa, apiosa, galactosa, ramnosa o xilosa) a partir de un enlace glucosídico (Jiménez y Riguera. 1994). Posteriormente, el kaempferol (**1**) fue aislado de 2 especies más de *Ternstroemia tepezapote* (Jo y cols 2005) y *Ternstroemia pringlei* Rose Standl junto con otros compuestos como quercetina (**2**) y rutina (**3**) (**Figura 1**) (Aguirre, González, Pérez, Llanos y Guevara. 2011).



Kaempferol (1)



Quercetina (2)



Rutina (3)

www.bdigital.ula.ve

Figura 1. Flavonoides del género *Ternstroemia*

Tomado y modificado de Aguirre,
González, Pérez, Llanos y Guevara

Ternstroemia acrodantha

Es una especie de árboles que llegan a medir de 7 a 24 metros de alto entre 30 a 40 cm de diámetro; sus hojas simples alternadas miden de 6,7 a 9,5 cm de largo, elípticas u obovadas, tiene base cuneada, sus márgenes punteados, subenteros y ápices agudos hasta redondeados (rara vez discretamente emarginados), con venación broquidódroma festoneada, inflorescencia solitaria, por lo general agrupadas en el ápice de las ramas, donde llegan a formar falsos corimbos y pedúnculos relativamente largos, 1,8 a 4,7 cm; sus flores hermafroditas de 1,5 a 1,8 cm de diámetro, con los pétalos

blancos, apenas unidas a la base, carnosos, extendido o reflejo cerca del doble del largo de los sépalos; estambres numerosos, discretamente apiculados, pistilos con un estiloide de longitud similar a la del ovario, en su conjunto tan largo como los pétalos, coronado por un estigma discretamente peltado; su fruto es capsular con dehiscencia subvalvar de 2,5 a 2,9 cm de diámetro, con un ostro conspicuo y pericarpio relativamente grueso (2 a 4 mm); semillas de 0,7 a 0,9 reniforme, lisas, con una cobertura desprendible de papilas rojas carnosas (Steyserm, 1952).

Esta especie se encuentra dentro del orden de los Ericales (Moreno, 2019), pertenece a la familia Ternstroemiaceae (Luna y colaboradores, 2004) del género *Ternstroemia* y su especie es *Ternstroemia acrodantha* (**Figura 2**) (Steyserm., 1952). Es una especie endémica perteneciente a las cordilleras Andinas Venezolanas. Se ha estudiado en las zonas de la carbonera a 2600 m.s.n.m; Aristiguieta a 2860 m.s.n.m; Los Molinillos a 1968 m.s.n.m; Bautista 2031 m.s.n.m; La Mucuy 2540 m.s.n.m; La Carbonera 1953 m.s.n.m; San Eusebio 2300 m.s.n.m en el Estado Mérida (Steysermark. 1952).



Figura 2. Hojas de la especie *Ternstroemia acrodantha*

Tomado y modificado de Kobuski & Steyserm.

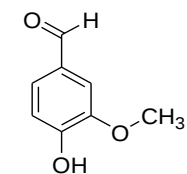
Bases teóricas

Productos naturales

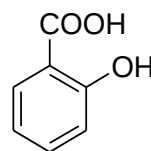
En sentido amplio un producto natural está formado por todos los compuestos de la naturaleza, de forma más restrictivo un producto natural comprende solo los metabolitos secundarios que son específicos de las especies (Gutiérrez y Estévez, 2009). Estos compuestos deben diferenciarse de los metabolitos primarios que son los productos químicos necesarios para la vida, resultantes del metabolismo vital de todo ser vivo, como son: los carbohidratos, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos (Torres, 2004). Los metabolitos secundarios presentes en los productos naturales son clasificados de la siguiente manera (Bruneton, 2001):

www.bdigital.ula.ve

- a) Fenoles: La denominación de compuestos fenólicos se puede aplicar a todos los compuestos orgánicos que poseen como mínimo una función carboxílica y un hidroxilo fenólico. Los fenoles simples (catecol, guayacol, floroglucinol) son bastante escasos en la naturaleza salvo la hidroquinona que se encuentra en diversas familias, frecuentemente en forma de glucósido del difenol o de su monometiléter. Los alquilfenoles y sus dépsidos, que provienen del metabolismo de un poli- β -cetoéster, son característicos de los líquenes (Bruneton, 2001). Ejemplos de estos derivados son la vainillina (4) y el ácido salicílico (5) (**Figura 3**) actúan como reguladores del crecimiento vegetal, implicados en la resistencia de la planta frente a patógenos (Ávalos y Pérez, 2009).



Vainillina (4)

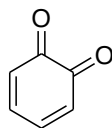


Ácido salicílico (5)

Figura 3. Ejemplos de fenoles

Tomado y modificado de Avalos y Pérez

- b) Quinonas: Las quinonas son dicetonas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles los que fácilmente las regeneran por oxidación. Contribuyen a la coloración de numerosos vegetales y animales, debido a sus pigmentos que van de amarillo a violeta. Algunos como la vitamina K, la ubiquinona y las plastoquinonas contribuyen en la respiración donando electrones y por ende se encuentran en todos los seres vivos (Domínguez, 1973). En diversas familias, frecuentemente en forma de glucósido del difenol o de su monometiléter. Los alquilfenoles y sus dépsidos, que provienen del metabolismo de un poli- β -cetoéster, son característicos de los líquenes (Bruneton, 2001). Las quinonas se clasifican en benzoquinonas (6) (**Figura 4**), naftaquinonas, antraquinonas y fenantraquinonas. Si los grupos cetónicos están continuos se les llama orto y si están separados por un grupo vinilo ($-C=C-$) para (Domínguez, 1973).

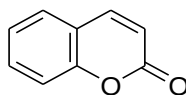


orto-benzoquinona (6)

Figura 4. Estructura de una *orto*-benzoquinona

Tomado y modificado de Domínguez, 1973

- c) Cumarinas: Las cumarinas naturales poseen oxígeno en una o más de las seis posiciones nucleares disponibles, ya sea como fenoles, éteres o grupos glicósidos. Salvo pocas excepciones, se encuentran oxigenadas en C-7, en consecuencia, la 7-hidroxycumarina está biogénica y estructuralmente emparentada con las más complejas cumarinas. Es común, en muchas de ellas la presencia de cadenas isoprenicas enlazadas a un carbono del núcleo, a un átomo de oxígeno o a ambos. Estos grupos prenilos pueden encontrarse como una simple unidad de 3-metil-2-butenil, pero muchas veces es encontrado como su correspondiente epóxido o diol, en una variedad de oxidaciones y formas reacomodadas de estas cadenas isoprenicas (Barata y Debenedetti, 2007). Un ejemplo de cumarina, es escopoletina (7) (Figura 5).



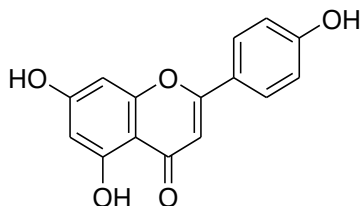
Escopoletina (7)

Figura 5. Estructura de una cumarina

Tomado y modificado de Barata y Debenedetti

d) Flavonoides: Los flavonoides son sustancias de bajo peso molecular producidas por casi todas las plantas vasculares. Los flavonoides están compuestos de dos anillos fenilos, ligados mediante un anillo pirano, lo cual nos deja en un esqueleto de difenilpiranos: C6-C3-C6 común en la mayoría de los flavonoides (Escamilla, Cuevas y Guevara, 2009). La mayor parte de los flavonoides (a excepción de las catequinas) está presente en las plantas y alimentos en forma de β -glicósidos; los flavonoides una vez hidrolizados (agliconas o flavonas) se conjugan por metilación, sulfatación o glucuronidación principalmente y debido a que tienen una capacidad de conjugación alta su concentración en el plasma es por lo general baja; los flavonoides se dividen inicialmente en tres clases, dependiendo del sitio de unión del anillo B con el benzopirano: los flavonoides (2- fenilbenzopiranos), isoflavonoides (3-benzopiranos) y los neoflavonoides (4- benzopiranos) (Estrada, Ubaldo y Araujo, 2012).

Se ha reportado que los flavonoides poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anti-trombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, antiasmáticas e inhibidoras de enzimas como la transcriptasa reversa. Sin embargo, la principal propiedad biológica de los flavonoides y la más estudiada ha sido su actividad antioxidante (Pérez, 2003). Un ejemplo de un flavonoide lo podemos observar en la **Figura 6**, donde se muestra la estructura de la flavona apigenina (8).

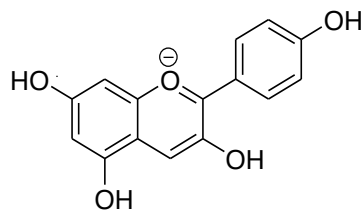


Apigenina (8)

Figura 6. Estructura de una flavona

Tomado y modificado de Pérez

e) Antocianinas: Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles, estos pigmentos son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en varias frutas, vegetales y cereales. Estos compuestos son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos unidos por una cadena de 3 carbonos. En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad (Garzón, 2008). Un ejemplo de una antocianina lo podemos observar en la **Figura 7**, donde se muestra la estructura de una pelargonidina (9).



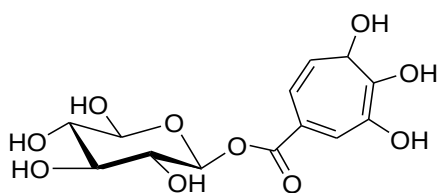
Pelargonidina (9)

Figura 7. Estructura de la antocianina

Tomado y modificado de Garzón

f) Taninos: Los taninos son sustancias con propiedades similares a los de los agentes tánicos comerciales los cuales precipitan alcaloides y proteínas; se caracterizan por ser sustancias astringentes, generalmente amorfos que pueden ser solubles en agua o soluciones hidroalcohólicas; precipitan en soluciones acuosas con proteínas, especialmente albumina y gelatina, son fácilmente oxidables y se utilizan para el endurecimiento del cuero (Albornoz, 1980). Los taninos se clasifican en:

- Hidrolizables (galotaninos y elagitaninos): aquellos que por tratamiento con ácido o por enzimas, se separan en la aglicona y en azúcares (Marcano y Hasegawa, 2002).
- Condensados: aquellos que por tratamiento no se degradan, polimerizan aún más, convirtiéndose en masas amorfas insolubles conocidas como flobafenos, estos son polímeros derivados de 3-hidroxi y 3,4-dihidroxi-flavonas (Marcano y Hasegawa, 2002). Un ejemplo de un compuesto tanino lo podemos observar en la **Figura 8**, donde se muestra la estructura de la glucogalina (**10**).



Glucogalina (**10**)

Figura 8. Estructura de un tanino

Tomado y modificado de Marcano y Hasegawa

g) Alkaloides: Los alcaloides son sustancias básicas que contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico, son derivados de aminoácidos, presentan distribución taxonómica limitada y se encuentran en plantas superiores como sales de un ácido orgánico (Martínez, Valencia, Jiménez y Galeano, 2008). Atendiendo a su solubilidad, propiedad empleada para extraerlos y purificarlos, la base del alcaloide es soluble en solventes orgánicos y pueden formar sales solubles en solventes polares cuando se encuentra en ácidos minerales diluidos (Martínez y cols, 2008). Un ejemplo de un alcaloide lo podemos observar en la **Figura 9**, donde se muestra la estructura de papaverina (**11**).

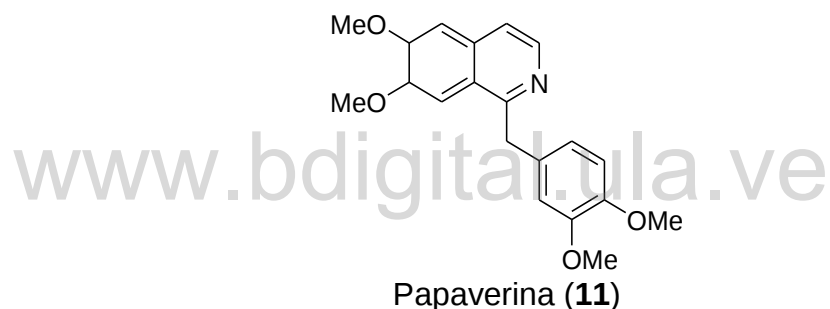
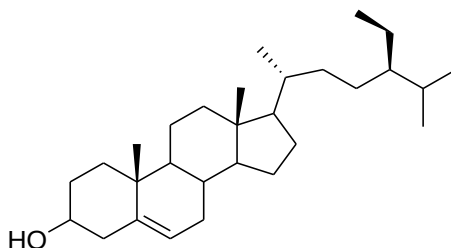


Figura 9. Estructura de un alcaloide

Tomado y modificado de Martínez,
Valencia, Jiménez y Galeano

h) Esteroles: Son alcoholes sólidos con 27 a 29 átomos de carbono, de origen animal; su esqueleto está formado fundamentalmente por un ciclopentano perhidro fenantreno, común a todos los esteroides y una cadena lateral en la que puede insertarse radical metilo (serie ergostano) o etilo (serie estigmastano), particularmente en C24; todos los esteroides poseen un grupo hidroxilo en C-3 (Domínguez, 1973). Un ejemplo de un esteroide se

puede observar en la **Figura 10**, donde se muestra la estructura del sitosterol (**12**).

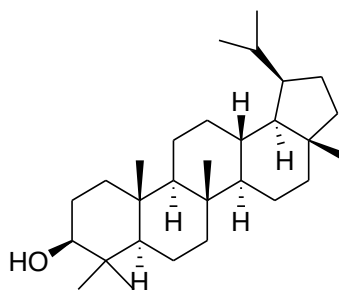


Sitosterol (**12**)

Figura 10. Estructura de un esteroide

Tomado y modificado de Domínguez

- i) Triterpenos: Presentan 30 átomos de carbono poseen una estrecha relación con los esteroides y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza tanto en el reino vegetal como en el animal (Marcano y Hasegawa, 2002). Un ejemplo de un compuesto triterpeno lo podemos observar en la **Figura 11**, donde se muestra la estructura del lupeol (**13**).

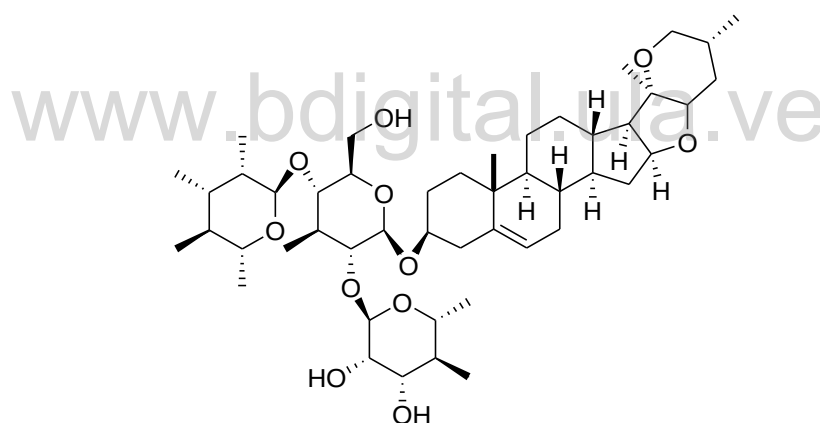


Lupeol (**13**)

Figura 11. Estructura de un triterpeno

Tomado y modificado de Marcano y Hasegawa

j) Saponinas: Las saponinas son metabolitos secundarios que constituyen una gran familia de compuestos estructuralmente constituidos por un anillo terpenoide o esteroidal, conocidos como aglicona o sapogenina, sustituidos por oligosacáridos a través de enlaces glucosídicos que les confieren un carácter anfifílico; de acuerdo con el número de sustituciones, se pueden encontrar agliconas mono, di o triglicosiladas, también denominadas mono, di o tridesmosídicas (Ahumada, Ortega, Chito y Benítez, 2016). Un ejemplo de un compuesto saponina lo podemos observar en la **Figura 12**, donde se muestra la estructura de la dioscina (**14**).



Dioscina (**14**)

Figura 12. Estructura de una saponina

Tomado y modificado de Ahumada,

Ortega, Chito y Benítez

Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico, es una de las etapas iniciales de la investigación, esta permite determinar cualitativamente los principales grupos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Consiste en la extracción con solventes apropiados (hexano, etanol, cloroformo, agua) (Palacios, 2015). Las reacciones se fundamentan de la siguiente manera:

- a. Ensayo de reconocimiento de alcaloides: Son de carácter alcalino y pueden formar sales con ácidos diluidos. estas sales de alcaloides son solubles en medio acuoso de ácidos, pero cuando reaccionan con sales de metales pesados tienden a insolubilizarse formando precipitados. Los ensayos químicos usados para el reconocimiento incluyen varios ensayos de precipitación, con diferentes reactivos como son el reactivo de Dragendorff, el reactivo de Mayer, el reactivo valser, el reactivo Reineckato de amonio, el reactivo de Wagner, entre otros Teniendo en cuenta la toxicidad de muchos de estos reactivos, que utilizan sales de metales pesado como el mercurio, es recomendable el uso del reactivo de Wagner (Martínez. 2020).

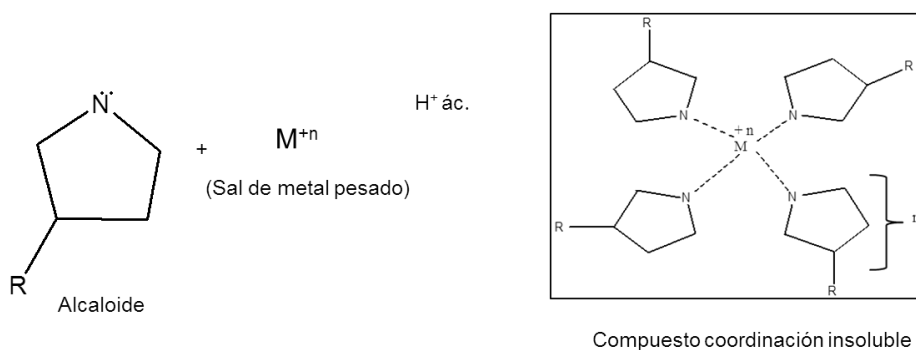


Figura 13. Reacción que explica la formación de compuestos insolubles entre un alcaloide y una sal de metal pesado

Tomado y modificado de Martínez. 2020

- b. Ensayo de reconocimiento de compuesto fenólico: Debido a la gran cantidad y variedad estructural de las diferentes clases de compuesto fenólicos naturales, utilizan diferentes ensayos de coloración para su reconocimiento preliminar en muestras biológicas. En ensayos más utilizados es el del cloruro férrico. En este ensayo es una solución acuosa o alcohólica de una muestra vegetal, se hace reaccionar con una solución de cloruro férrico acuoso o alcohólico, en concentración del 1%. Los compuestos fenólicos tienden a formar complejos de diferentes colores con el catión Fe^{+3} , la formación de color o precipitado oscuro es aceptable con un resultado positivo sobre la presencia de compuesto fenólico. No obstante, hay compuesto fenólicos de baja polaridad que no dan resultado positivo con este ensayo, por lo que se requiere otro tipo de análisis diferente (Martínez. 2020).

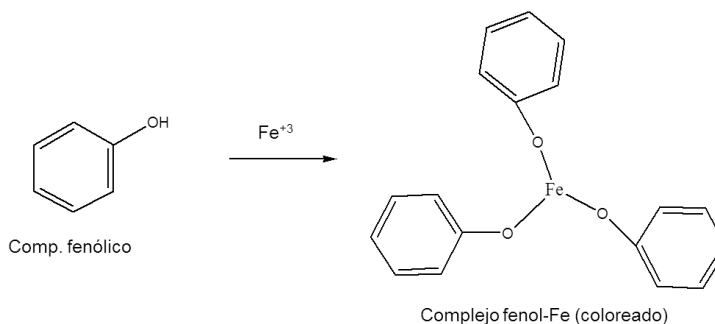


Figura 14. Reacción de formación de complejos coloreados de un compuesto fenólico con una sal de hierro III.
Tomado y modificado de Martínez. 2020

- c. Ensayo de reconocimiento flavonoides: los flavonoides representan un grupo importante de sustancias con propiedades antioxidantes, estos contiene en su estructura un sistema anular γ -benzopirona, reaccionan con iones Mg^{+2} y ácido, para formar complejos coloreados de color rojo a violeta. Por tanto, la formación de coloraciones rojo a violeta, es considerada un resultado positivo que permite inferir la presencia de flavonoides en la muestra analizada. A este ensayo se le conoce como ensayo de Shinoda. Es importante mencionar que algunas clases de flavonoides como las chalconas y las cateninas, no dan resultado positivo con este ensayo (Martínez. 2020).

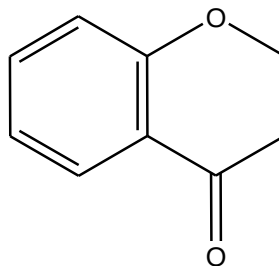


Figura 15. Sistema benzopirona
Tomado y modificado de Martínez. 2020

- d. Ensayo de reconocimiento de terpenoides: los terpenos comprenden una gran cantidad de sustancias naturales con estructuras como desde las más simples hasta otras con gran complejidad estructural (esteroles, triterpenos, etc.) la mayoría de estas sustancias contiene grupos funcionales tales como los enlaces dobles de $C=C$, hidroxilo de alcohólico, puente de éter, grupos carboxilo, grupos éster. Con lo excepción del carboxilo, los demás son grupos funcionales son relativamente poco reactivos para detectarlos mediante ensayos químicos rápidos y confiables. Los terpenoides se pueden reconocer mediante el ensayo de Liebermann-Buchard (Martínez. 2020).
- e. Ensayo de reconocimiento saponinas: las saponinas son glucósidos que por hidrolisis liberan una o más unidades de azúcar y aglicones libres de azúcares que son liberados del sistema anillo policíclico (sapogeninas). Las sapogeninas pueden ser biterpenoides o esteroides. Existen varios métodos para la cuantificación de saponinas entre las que se encuentran afrosimétricos, volumétrico, espectrofotométricos y cromatográfico, el método con mayor frecuencia utilizado es el de la medición de espuma (afrosimétricos) (Tuñón.2002)

Extractos vegetales

La preparación de los extractos vegetales se realiza extrayendo los principios activos de las plantas, teniendo como objetivo conservar los componentes en forma concentrada y uniforme. El material vegetal fresco o seco se trata con solventes apropiados tales como; agua, alcohol, éter, cloroformo, entre otros, luego estos se concentran a una consistencia determinada, obteniéndose los extractos (Albornoz, 2001), entre los métodos de obtención se pueden mencionar:

1. Por arrastre de vapor: Se utiliza para la extracción de aceites esenciales ya que éstos contienen compuestos volátiles o aromáticos como los alcoholes y cetonas, siendo este método perfecto para su extracción mediante el uso de vapor saturado a presión atmosférica; al líquido acuoso que se obtiene se le hace extracción con cloroformo y el extracto clorofórmico que se obtiene se lleva al rota vapor y luego a una columna para separación cromatografía (Rivas, Oranday y Verde, 2016).
2. Calentamiento por reflujo: se utiliza para condensar vapores producidos en la calefacción y volver estos condensados al recipiente de reacción, este método garantiza que no se pierda el disolvente (Baez, 2021).
3. Fluidos supercríticos: Un fluido supercrítico es una sustancia, mezcla o elementos que, mediante operaciones mecánicas, bajo unas condiciones operativas de presión y temperatura, se sitúa por encima de su punto crítico, pero por debajo de la presión que hace falta para condensarlo en un sólido (Valcárcel y Gómez, 1988).
4. Extracción sólido-líquido: La extracción de muestras sólidas con solventes, generalmente conocida como extracción sólido-líquido, es un método muy utilizado en la separación de compuestos antioxidantes a

partir de residuos sólidos; estos residuos requieren la extracción con solventes convencionales y la posterior eliminación de estos para obtener un extracto concentrado; los solventes más habituales son agua acidificada, etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclo hexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo (Tábío, Díaz, Rondón, Fernández y Piloto, 2017).

5. Maceración: Es un método de extracción sólido-líquido donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción a utilizar; para realizar el proceso se corta o muele el material vegetal, fresco o seco, se coloca en recipientes adecuados, se coloca el disolvente seleccionado por polaridad: hexano, cloroformo y finalmente etanol o metanol en reposo con un equipo en agitación continua a temperatura ambiente durante un intervalo de días que puede ser de 3 a 5 (Rivas y cols, 2016).
6. Infusión: El disolvente se hierve y posteriormente se introduce la planta a extraer, dejándose enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente; el extracto recibe el nombre de infusión o té (Valcárcel y Gómez, 1988).

Bacterias

Las bacterias son organismos procariotas que no poseen organelos, el material hereditario de las bacterias consisten en un solo cromosoma, llamado nucleóide bacteriano y está estructurado en una cadena de ADN que se encuentra dentro del citoplasma, no posee membrana nuclear, la información se almacena en el ADN y es transcrita por el ARNm que se une a los ribosomas, donde se traduce a proteínas específicas por la polimerización de los aminoácidos (Braude, 1984).

Las bacterias se clasifican según sus características macroscópicas y microscópicas, la caracterización inicial por los aspectos macroscópicos se realiza en función a los rasgos de crecimiento en distintos nutrientes, y medios de cultivos selectivos; también a las distintas colonias bacterianas tales como, su color, forma, tamaño y olor, sus propiedades metabólicas como, la capacidad de resistir frente a determinados antibióticos, fermentación de azúcares específicos, también con capacidad hemolítica o hidrolizar lípidos. Los aspectos microscópicos incluyen, tamaño, forma, y configuración de las bacterias (cocos, bacilos, curvos, espirales) y la capacidad de captar el colorante Gram (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).

La tinción de Gram permite al clínico distinguir entre las dos clases fundamentales de bacterias como son, las bacterias Gram positivas de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, cuya pared celular está compuesta por capas gruesas de peptidoglicano, lo cual hace que se deshidrate y sus poros se mantengan cerrados durante la coloración de Gram reteniendo el colorante violeta de genciana y al microscopio se observa de color púrpura (Ramírez, 2015).

Mientras que las bacterias Gram negativas de los géneros *Klebsiella*, *Salmonella*, *Proteus*, *E. coli*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*,

Campylobacter, entre otros, son bacterias cuya pared celular está compuesta por altos contenido de lípidos, lo cual hace que al decolorar queden poros en la pared y permita la salida del compuesto violeta de genciana-yodo y al agregar el colorante de contraste, la safranina, tomen un color rosado (Ramírez, 2015).

Las bacterias que no se pueden clasificar en función del resultado con el Gram se incluyen al género *Mycobacterium*, estas consta de una cubierta externa de tipo céreo y que se distinguen bien con la tinción ácido alcohol resistente y el género *Mycoplasma* no poseen péptidoglicano (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).

Antibióticos

Se definen como antibióticos aquellos metabolitos secundarios productos de ciertos microorganismos que son capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos o de destruirlos (Marcano y Hasegawa. 2002).

Clasificación

Los antibióticos se clasifican según su origen, en los que se encuentran, los antibióticos naturales, estos son sintetizados por organismos vivos (penicilinas, polimixinas, cloranfenicol), también en esta clasificación se encuentran los sintéticos, estos son generados mediante la síntesis química y los semisintéticos, los cuales sufren modificaciones químicas de moléculas sintetizadas por microorganismos vivos (ampicilinas, cefalosporinas) (Braude, 1984).

Los antibióticos también se clasifican según su tipo de acción, como son, bacteriostáticos, los cuales inhiben el crecimiento del microorganismo y los

bactericidas que mata al microorganismo sin necesidad de destruirlo o lisarlo (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009)

Estos antibióticos presentan un espectro de acción, entre los que se encuentran los de, espectro reducido, estos son activos frente a un grupo determinado de bacterias, como son, macrólidos (cocos Gram positivos) y gentamicinas y los de espectro amplio, que presenta actividad frente a grupos bacterianos de importancia clínica, entre ellos se encuentran, las penicilinas (cocos Gram positivos, bacilos Gramnegativos y bacilos Gramnegativos), también las ampicilinas cocos Gram positivos y cocos Gramnegativos (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).

Existe otra clasificación, que depende de su composición química, como son:

1) Betalactámicos

- Penicilinas: Es el grupo más amplio de los antibióticos, entre los betalactámicos se encuentran el grupo de las penicilinas, entre las que se encuentran las penicilinas naturales, estos antibióticos activos frente a todos los *Streptococcus B-hemolíticos* y otros *Streptococcus*, también presenta actividad reducida frente a *Staphylococcus* y es inactivo a bacilos Gram negativos; mientras que las penicilinas resistentes a penicilinasas, estas son similares a las penicilinas naturales pero tiene mayor actividad frente a *Staphylococcus*; las aminopenicilinas ellas presentan actividad frente a cocos Gram positivos y son activas frente a algunos bacilos Gram negativos, siendo la piperacilina las más activa; mientras que los betalactámicos con inhibidores de la betalactamasa son antibióticos combinados con un inductor como la amoxicilina con ácido clavulánico, piperacilina tazobactam, ampicilina sulbactam, tiene mejor actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus* productores de

Betalactamasa y algunos bacilos Gram negativos, sin embargo no inhiben todas las Betalactamasas (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).

- Cefalosporinas: Entre el grupo de las cefalosporinas, están presentan varios grupos, entre los que se encuentran las cefalosporinas de espectro reducido, esta tiene actividad equivalente a la oxacilina (perteneciente al grupo de las penicilinas) frente a bacterias Gram positivas y actividad frente a algunos Gram negativos como son *E. coli*, *Proteus mirabilis*; también se encuentra en este grupo las cefalosporinas de espectro amplio, tiene una actividad mejorada frente a Gram negativos que incluye *Enterobacter*, *Citrobacter* y algunas especies de *Proteus* y *Pseudomonas* (Munrray, Rosenthal y Pfaller. 2009).
 - Carbapenemos: Estos son antibióticos de gran espectros activos frente a la mayoría de Gram positivos y Gram negativos, no se incluye *Staphylococcus* resistente a oxacilina, la mayoría de los *Enterococcus* y algunos bacilos Gram negativos (*Burkholderia*, *Strephomonas* y *Pseudomonas*) (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).
 - Monobactámicos: Este es activo frente a determinados bacilos Gram negativos pero inactivo en cocos Gram positivos (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).
- 2) Polipéptidos: En este grupo se encuentra la Bacitracina, se emplea por vía tópica en el tratamiento de infecciones cutáneas por bacterias Gram positivas (*Streptococcus* y *Staphylococcus*), las bacterias Gram negativas son resistente a este antimicrobiano (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).

- 3) Amino glucósidos: Se componen de amino azucares unidos mediante enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol, este grupo se emplea en como tratamiento de infecciones sistémicas producidas por bacterias Gram negativas (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).
- 4) Tetraciclinas: Son antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro que inhiben la síntesis proteica de las bacterias (Murray Rosenthal y Pfaller. 2009).
- 5) Glicilciclinas: Son derivado semi sintético de minociclina, tienen un amplio espectro de actividad frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas aunque *Proteus*, *Morganella* *Providencia* y *Pseudomona aeruginosa* suelen ser resistente (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).
- 6) Oxazolidonas: Son antibióticos de espectro reducido, dispone de actividad frente a todos los *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus* (incluso aquellas cepas con resistencia a vancomicina y amino glucósidos), los *Enterococcus* son difíciles de tratar, por lo que se reserva generalmente este tipo de antibiótico para estas infecciones (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).
- 7) Macrólidos: La estructura básica de este tipo de antibiótico consta de un anillo de lactona macrocíclico unido a dos azucares, desoxamina y cladinosa. Las modificaciones en la estructura del macrólido han dado lugar al desarrollo de nuevos fármacos, como Azitromicina y Claritromicina. Se han utilizado como tratamiento de infecciones del aparato respiratorio causados por los géneros *Mycoplasma*, *Legionella*

y *Chlamydia* , así como en el tratamiento de infecciones por especies del género *Campylobacter* y bacterias Gram positivas en pacientes alérgicos a la penicilina, casi todas las bacterias Gram negativas son resistentes a macrólidos. (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).

- 8) Clindamicinas: Es un antibiótico derivado de vancomicina, este fármaco es activo frente a *Staphylococcus* y bacilos Gram negativos anaeróbicos, pero, por lo general, carece de actividad frente a bacterias Gram negativas aeróbicas (Murray Rosenthal y Pfaller. 2009).
- 9) Estreptomina: Este antimicrobiano conforma un grupo de péptidos cíclicos producidos por el género *Streptomyces*, estos antibióticos se administra con la combinación de dos componentes, las estreptograminas del grupo A y estreptograminas del grupo B, las cuales actúan de forma sinérgica para inhibir la síntesis proteica. Este antibiótico combinado dispone de actividad a *Staphylococcus* y *Enterococcus faecium* (pero no para *Enterococcus faecalis*), la administración de este antibiótico ha quedado restringida básicamente al tratamiento de las infecciones por *E. faecium* resistente a vancomicina (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).
- 10) Quinolonas: Se trata de antibióticos sintéticos, este antibiótico se empleó como tratamientos de infecciones urinarias causadas por diversas bacterias Gram negativas (ácido nalidíxico), este antibiótico ha sido remplazado actualmente por otras quinolonas más nuevas (fluoroquinolonas) que se obtuvieron mediante modificaciones del núcleo de quinolona formado por dos anillos, estos antibióticos poseen una excelente actividad frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas aunque *Staphylococcus* resistente a oxacilina y *Enterococcus*

puede desarrollar resistencia con cierta rapidez (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).

11) Rinfampicina: Es un derivado semi sintético de la rinfamicina B, se utiliza frecuentemente en combinación con uno o más antibióticos ya que la resistencia puede aparecer de forma rápida (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).

12) Sulfonamidas: Son activos frente a un amplio espectro de organismos Gram positivos y Gram negativos, las sulfonamidas de acción breve, como sulfisoxazo, constituye uno de los fármacos de elección para tratar infecciones agudas y crónicas de las vías urinarias por bacterias sensibles, como *E. coli*. La combinación del trimetoprim-sulfametoxazol posee actividad frente a una gran variedad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos; esta combinación es eficaz en el tratamiento de las infecciones bacterianas de las vías respiratorias bajas, otitis media y gonorrea no complicada causada por *Pneumocystis carinii* (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).

Mecanismo de acción de los antibióticos

Estos presentan una estrategia frente a las infecciones ocasionadas por las diferentes bacterias, entre estos mecanismos se encuentran; los que inhiben síntesis de la pared celular, como es la síntesis de peptidoglicano (PBP), los antibióticos que ejercen dicha acción son: Los Betalactámicos, Glucopéptidos y las Bacitracina; cuando las bacterias en proliferan, ellas se exponen a estos antibióticos, por lo tanto fármaco se une a una PBP específicas de la pared celular bacteriana e inhibe la formación de puentes entre cadenas de peptidoglicano, a su vez este proceso activa ciertas auto

lisinas que degradan la pared celular y originan la destrucción celular (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).

Otros antibióticos actúan sobre la membrana externa de la pared celular, este grupo de antibióticos son las polimixinas; la presencia de estos antibióticos altera la permeabilidad de la membrana bacteriana, como son los lipoposacáridos y fosfolípidos, lo cual al romperse produce la pérdida de los componentes intracelulares esenciales y produce la muerte de la bacteria (Murray Rosenthal y Pfaller. 2009). Por otro lado se encuentran los antibióticos con acción en la síntesis ADN, ARN, como es el caso de la rifampicina que se une a la polimerasa de ARN dependiente de ADN e inhibe la síntesis de ARN y en el caso de las quinolonas, estas actúan inhibiendo a la enzima topoisomerasa del ADN; en las bacterias Gram positivas estas penetran directamente a través de la membrana celular hasta alcanzar el citoplasma, mientras que en las bacterias Gram negativas el fármaco penetra a través de las porinas para llegar al citoplasma; posteriormente actúan a nivel del ADN bacteriano produciendo la inhibición de las topoisomerasas (ADN-girasa y topoisomerasa IV), que al unirse las quinolonas a las sub unidades de la ADN girasa se produce la aparición de extremos libres de ADN, sobre los cuales actuarán la exonucleasa que producirá la muerte celular (Rodríguez, 2005).

También se encuentra otro grupo de fármacos que actúan sobre la síntesis de proteínas, en los que se encuentran los aminoglucósidos, tetraciclinas y glicilciclinas; los aminoglucósidos para ejercer su acción atraviesan la membrana externa bacteriana (bacterias Gram negativas) la pared celular y la membrana citoplasmática hasta llegar al citoplasma donde inhiben la síntesis de proteínas mediante su unión irreversible a las proteínas ribosómicas 30S; esta unión a los ribosomas tiene dos efectos, la producción de proteínas anómalas como resultado de una lectura incorrecta del ARNm y la interrupción de la síntesis de proteína a raíz de la separación precoz del

ribosoma del ARNm (Murray Rosethal y Pfaller. 2009). En el caso de las tetraciclinas estos son antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro que inhiben la síntesis proteica de las bacterias al unirse de forma reversible a la sub- unidad 30S del ribosoma, inhibiendo así la unión del aminoacil ARN de transferencia (ARNt) al complejo ribosoma 30S- ARNm; por otra parte las Glicilciclinas tiene un espectro similar a Tetraciclina pero más activas frente a las bacterias Gram negativas y las *Micobacterias* de crecimiento rápido (Murray, Rosethal y Pfaller. 2009).

Los fenicoles en contraste con los aminos glucósidos, pero se diferencia porque se une exclusivamente a la sub- unidad 50S del ribosoma de modo que se bloquea cuando este se liga a la porción del ribosoma (Braude, 1984). Mientras los macrólidos ejercen su acción por medio de la unión reversible al ARNr 23S de la sub-unidad ribosómica 50S, la cual inhibe la elongación polipeptídica (Murray Rosethal y Pfaller. 2009). Las lincosamidas actúa como los fenicoles al inhibe la síntesis de proteínas y la transferencia de aminoácidos desde el ARNt al polipeptido en el ribosoma e impide la elongación, más que la iniciación de las cadenas peptídicas (Braude, 1984). En las estreptograminas la molécula dalfopristina se une a la sub- unidad ribosómica 50S e induce el cambio conformacional que facilita la unión de quinupristina. La primera molécula impide la elongación de la cadena peptídica, mientras la segunda provoca la liberación prematura de las cadenas peptídicas por parte del ribosoma (Murray Rosethal y Pfaller. 2009). Las oxazolidonas inhibe el comienzo de la síntesis proteica al interferir con la formación de un complejo de inicio formado por el ARNt, el ARNm y el ribosoma. Se une a la sub-unidad 50S de ribosoma, de forma que distorsiona el sitio de unión del ARNt y evita la formación del complejo 70S. Este mecanismo de acción es exclusivo de las oxazolidonas, por lo que no existe resistencia cruzada con otro antibiótico inhibidores de la síntesis proteica (Murray, Rosethal y Pfaller. 2009).

Resistencia Bacteriana

La resistencia bacteriana es la estrategia que tienen las bacterias para disminuir o inactivar la acción de los agentes microbianos frente a los ataques para poder persistir en el hospedador. Existen diferentes tipos de resistencias entre ellos se encuentran (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009):

Barrera de acumulación, entre las cuales se encuentran los que alteran la barrera de permeabilidad, este tipo de resistencia modifica la configuración de las porinas y proteínas de membrana, donde los factores que intervienen en este proceso está relacionado con la carga eléctrica del compuesto y su composición hidrofóbica, las bacterias tienen la capacidad de generar mutaciones en las porinas que cambia su estructura y evita que estas sean utilizadas por los antibióticos como su canal de entrada; mientras que la bomba eflujo o expulsión permite un intercambio dinámico, permitiendo el ingreso de sustancias necesarias para su desarrollo y eliminando sustancias tóxicas para su supervivencia del espacio periplásmico al espacio extracelular (Correa, De La Cadena, Rojas, Falco, Aranaga, Alonso y Perenguez. 2021).

Las alteraciones del sitio blanco en las bacterias, puede ocurrir mutaciones capaces de alterar el sitio donde se fijan y actúan los antibióticos, impidiendo que pueda interrumpir una función vital de las bacterias en las que se encuentra la alteración de la ADN-girasa y topoisomerasa IV por mutaciones puntuales en los genes *gyrA* y/o *parC* (Correa y cols. 2021).

La inactivación de las bacterias se presenta debido a que las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que esta pierda su función. Dentro de este fenómeno se encuentran las enzimas denominadas modificadoras de aminoglucósidos, que catalizan la modificación del antibiótico a través de N-actilación, O-nucleotidilación o la O-fosforilación. El segundo grupo de enzimas son las betalactamasas, capaces

de hidrolizar los antibióticos betalactámicos, principal armamento para combatir las infecciones por bacterias multiresistentes (Correa y cols. 2021).

En general, todos o parte de estos mecanismos de resistencia pueden estar presentes en las bacterias Gram negativas y Gram positivas (Correa y cols. 2021), estas se clasifican de forma más específica de la siguiente manera:

Mecanismo de resistencia de las bacterias Gram positivas

- 1) Resistencia a betalactamasas tipo penicilinasas: Esta resistencia se encuentran presenten en *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus* y *Moraxella*, estas bacterias confieren resistencias a las penicilinas a excepción a las penicilinas resistentes a las betalactamasas (oxacilinas, meticilinas, cloxacilinas) (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).
- 2) Modificación de la PBP (gen mecA): Este tipo de resistencia se encuentra específicamente en *Staphylococcus* y confiere resistencia a todos los betalactámicos incluyendo los combinados con los inhibidores de la betalactamasa, no incluye a la cefalosporinas de 5ta generación (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).
- 3) Modificación de la PBO1a, PBP2b, PBP2x: Presente solo en *Streptococcus pneumoniae*, el cual presenta resistencia a todos los betalactámicos incluyendo a los inhibidores de la betalactamasa (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).
- 4) Modificación a nivel ribosomal (gen erm): En este tipo de resistencia se investiga al género *Staphylococcus* y especies como *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus betahemolíticos*, ellos confieren

resistencia a Macrólidos, Lincosamidas y estreptograminas. Se puede presentar resistencia de tipo constitutiva MLSc donde hay una clara resistencia a eritromicina y clíndamicina o inducible MLSi esta presenta resistencia a la eritromicina y una falsa sensibilidad a clíndamicina, por lo que se utiliza un inductor como eritromicina que contiene clindinosa (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).

- 5) Resistencia a alto nivel a la gentamicina: El género *Enterococcus* presenta la forma intrínseca de resistencia a bajo nivel de a los aminoglucósidos por un transporte deficiente al interior de la bacteria por lo que se utiliza este antibiótico para estudiar la presencia de del genero *Enterococcus* en sitios naturalmente estériles, se investiga si se puede o no utilizar una terapia combinada con el aminoglucósido y antibióticos activos contra la pared celular, en este caso, ampicilina, vancomicina, penicilina (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).

Mecanismo de resistencia de las bacterias Gram negativas

- 1) Betalactamasa resistentes a los inhibidores (IRT): Estos presentan resistencia a los aminopenicilinas, ureido penicilinas, e inhibidores de la betalactamasa y no presenta actividad en el resto de los betalactámicos (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).
- 2) Betalactamasa tipo AMPC: El cual presenta resistencia a penicilinas, cefalosporinas de 1er, 2da, 3era generación, monobactámicos, e inhibidores de la betalactamasa, no afectando la cefalosporinas e de 4ta generación ni carbapenemos. Se puede presentar una resistencia constitutiva. La cual se produce a bajos niveles, estas no producen resistencia pero cuando se des reprimen si confieren resistencia y las

inducibles (son plásmidicas) se observa una falsa sensibilidad, lo que indica que en terapias prolongadas puede haber falla terapéutica (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).

- 3) Betalactamasa de espectro extenso (BLEE): Este tipo de resistencia se presenta en todos los betalactámicos excepto en carbapenemos y cefamicinas ni agentes combinados con inhibidores betalactámicos (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).
- 4) Betalactamasa tipo carbapenemasa: Presenta dos tipos de resistencia, carbapenemasa tipo metalo este presenta resistencia a todos los betalactámicos excepto al aztreonam y la carbapenemasa tipo KPC confiere resistencia a todos los betalactámicos (Murray, Rosenthal y Pfaller. 2009).

Métodos para determinar la actividad antibacteriana

Las pruebas de susceptibilidad son técnicas esenciales en la investigación y los resultados pueden variar dependiendo de una gran variedad de factores en el desarrollo de las mismas (Bakht, Humaira y Haq, 2005). Los ensayos de sensibilidad deben de estar estandarizados y sujetos a procesos de control que aseguren la reproducibilidad; no existe un reglamento o estándar de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de los extractos de las plantas, como está establecido para los antibióticos, la mayoría de los métodos están basados en los utilizados para evaluar la resistencia o susceptibilidad a los antibióticos (Cowan, 1999).

Método de difusión

Es un método cualitativo, que se caracteriza por ser de fácil estandarización e indicado para microorganismos no exigentes y crecimiento rápido, este método está apoyado por datos clínicos y de laboratorio y además presenta la ventaja de ser reproducible; el método se desarrolla a base a los fundamentos descritos por (Bauer, Kirby, Sherris y Turck, 1966) en el método de Kirby-Bauer. Esta técnica se puede realizar ya sea en pozo o disco ya que actualmente ambos se encuentran estandarizados y son recomendados por el Subcomité de ensayos de susceptibilidad del NCCLS, de los Estados Unidos (Ramírez y Marín, 2009).

A través de este método se determina en forma cualitativa el efecto de ciertas sustancias a estudiar sobre cepas bacterianas las cuales pueden provenir de muestras aisladas de pacientes o bien ser de referencia (ATCC). El método se desarrolla en base a la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un método de cultivo adecuado y que se encuentre sembrado de forma homogénea con el microorganismo a estudiar y sobre el cual se coloca el papel filtro de 6 mm de diámetro o se deposita en un pozo en el agar de la placa una cantidad determinada de la sustancia a probar (extracto vegetal) (Burges; Jordan; Bregu; Meanns y Boyd, 1999).

Dilución y micro-dilución en caldo

Las técnicas de dilución y microdilución consisten en preparar una serie de tubos con una determinada cantidad de caldo de cultivo en cada uno, a la que se incorpora una cantidad de antibiótico creciente, de modo que se obtengan concentraciones dobles progresivas. Se siembran las bacterias, se incuban y a las 18-24 horas se observa el crecimiento. El tubo con la menor

concentración de antibiótico que ha inhibido la bacteria indica la concentración mínima inhibitoria (Prats, 2005).

Difusión en agar o Kirby Bauer

Este método consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano (Taroco y col. 2006).

www.bdigital.ula.ve

Definición operacional de términos

1. Escala de turbidez de MacFarland: Es un estándar que nos permite comparar la turbidez de la suspensión con el inóculo para evaluar si el tamaño del mismo es el apropiado para la prueba de susceptibilidad. Esta escala se prepara mezclando diferentes volúmenes de ácido sulfúrico al 1 % y de cloruro de bario al 1,175 %, para obtener soluciones con densidades ópticas específicas (Forbes y cols., 2009).
2. Efecto bactericida: Un producto bactericida provoca la muerte de las bacterias de manera irreversible (Gil, Perelli, Alvarado, Arias, Blumenthal, 2012).
3. Efecto bacteriostático: Es aquel que no destruye o mata las bacterias, pero si detiene su crecimiento, de tal manera que terminan muriendo sin reproducirse (Gil y cols, 2012).
4. Coloración de Gram: Es un tipo de coloración diferencial compuesta que permite clasificar a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas según la composición de su pared celular (Ramírez, 2015).
5. Reacciones colorimétricas: Se basa en la medida de absorción de radiación en la zona visible por sustancias coloreadas. En algunas ocasiones, la muestra que deseamos determinar no posee color por sí misma en tal caso es preciso llevar a cabo un desarrollo de color empleando reactivos que den lugar a sustancias coloreadas con la muestra que interesa estudiar (Aparicio, 2017).

Definición operacional de las variables

Hernández, Fernández y Baptista (2010), afirmaron que una variable es una propiedad que puede variar y cuya variación es susceptible de medirse. Por lo tanto, en el siguiente punto se establecen las variables a la **tabla 1** y **2**.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 1. Definición operacional de la variable independiente: Composición química de los extractos de las hojas de *Ternstroemia acrodantha*

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual ¿Qué es?
Composición química de los extractos de las hojas de <i>T. acrodantha</i>	Independiente o explicativa Cualitativa	Estudio de los componentes químicos de las plantas que comprende la extracción, separación y detección de dichos componentes mediante formación de compuestos colorados, cromatografía, radiación o fluorescencia (Flores, Castañeda, Montiel, y Hernández, 2014).
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
A través del tamizaje fitoquímico	Presencia de alcaloides (Ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer)/ cumarinas (Ensayo de hidróxido de amonio concentrado)/ compuestos fenólicos (Prueba con FeCl ₃)/ flavonoides (Ensayo de Shinoda)/ saponinas (Prueba de la espuma)/ taninos (Prueba de la gelatina)/ quinonas (Ensayo de hidróxido de amonio concentrado/ terpenos o esteroides (Ensayo de Liebermann-Burchard).	alcaloides (aparición de turbidez o un precipitado)/ cumarinas (azul- violeta bajo luz UV)/ Compuestos fenólicos (color azul o verde indica la presencia de fenoles)/ flavonoides (naranja o violeta, se considera prueba positiva)/ saponinas (prevalencia de espuma durante más de 5 minutos)/ taninos (precipitado o ruptura de la gelatina se considera positiva)/ quinonas (positiva si se presenta una coloración roja)/ terpenos y esteroides (coloración roja, verde o azul positiva para la prueba)

Tabla 2. Definición operacional de la variable dependiente: Actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Ternstroemia acrodantha*

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual ¿Qué es?
Actividad Antibacteriana de las hojas de <i>Ternstroemia acrodantha</i>	Dependiente o explicativa y discreta	Capacidad de una sustancia de inhibir la multiplicación o incluso de destruir una bacteria (Albornoz, 1980).
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	indicador
Difusión en disco de agar (Kirby Bauer)	<i>S. aeruginosa</i> ATCC 25923, <i>E. faecalis</i> ATCC 29212, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357, <i>E. coli</i> ATCC 25922	Halo de inhibición Resistente Sensible Sensibilidad intermedia

Hipótesis

Estudios previos indican que varias especies del género *Ternstroemia* producen metabolitos secundarios con diversa actividad biológica por lo que es de esperar que la especie *Ternstroemia acrodantha* contenga compuestos similares, los cuales, posean actividad antibacteriana.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

El proyecto realizado fue de tipo confirmatorio, según Hurtado (2010) lo define como un tipo de investigación cuyo propósito parte de una hipótesis o una investigación que conduce a propuestas de cambio, este modelo de investigación consiste en interpretar y explicar a partir de las relaciones que ya sean establecidos, en esta fase el investigador codifica, clasifica y analiza la información obtenida, la interpreta y le atribuye un significado; la fase confirmatoria genera como fruto el cumplimiento del objetivo planteado inicialmente.

En el proyecto de investigación se determinó la composición química de los extractos de las hojas de *T. acrodantha* y la actividad antibacteriana, basándose en estudios realizados por varios investigadores en otras especies pertenecientes a la familia Ternstroemiaceae.

Diseño de la investigación

El diseño de investigación es la estrategia general que ha adoptado el investigador para responder al problema planteado; en esta investigación se empleó un diseño de laboratorio, que consiste en recolectar datos a partir de fuentes vivas o materiales (Arias, 2012).

Población y muestra

La población no es más que el conjunto limitado de individuos de una misma clase que se unen entre sí por tener características comunes, las cual se estudia para la obtención de datos de la investigación (Martínez, 2002). En

la presente búsqueda la población es la planta entera de la especie *Ternstroemia acrodantha*. Este tipo de población puede ser denominada como no finita ya que la misma está constituida por todas las partes de la planta.

Según Martínez (2002), se entiende por muestra un subgrupo de la población que debe ser representativo de la misma, y que se extrae cuando no es posible medir a cada uno de las unidades de la población. En esta investigación, la muestra estuvo constituida por las hojas de *Ternstroemia acrodantha* que fueron recolectadas e identificadas por el Dr. José Grande, en el bosque nublado de San Eusebio en el municipio Andrés Bello del estado Mérida.

Instrumento de recolección de datos

Se tomó en cuenta que la recolección de datos se hizo por medio de hojas o cuaderno de trabajo; ya que es una investigación experimental de laboratorio, debe llevarse un registro de los resultados de cada prueba realizada, para posteriormente elaborar tablas que nos permitan medir, cuantificar los resultados obtenidos para tal fin.

Procedimiento de la investigación

Recolección del material vegetal

Las hojas de *Ternstroemia acrodanthe*, se recolectaron en el bosque Universitario de la localidad de San Eusebio ubicado en el municipio Andrés Bello del estado Mérida, Venezuela, a una altitud de 2320 m.s.n.m.

Se tomó una muestra espécimen para su identificación y elaboración de un voucher, que fue realizado por el Prof. Luis Gámez adscrito al Departamento del Herbario MER, de la Facultad de Forestal de la Universidad de Los Andes. La planta fue identificada botánicamente como *Ternstroemia acrodanthe* por el Dr. Pablo Meléndez, Dr. José Grande y el MSc Luis Gámez.

En el herbario Dr. Luis E. Ruiz T. de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA, Mérida, reposa un voucher de fecha 20 de junio de 2019 con número **1** de la colección, donde figuran como recolectores de la planta el Prof. Luis Gámez y la Br. Leysi Martínez, como se muestra en la **figura 16**.



Figura 16. Voucher de *T. acrodanthe*

Preparación de los extractos vegetales

Las hojas de la planta fueron seleccionadas y se colocaron en la estufa a 40 °C hasta completa sequedad, luego fueron molidas y se pesaron en la balanza Denver Instrument XL 3100 obteniéndose 82,5 g del material vegetal seco en el cual se representa en la **Figura 17**, se sometió a extracción mediante la técnica de maceración usando como solventes hexano y etanol, obteniendo 600 mg del extracto de hexano y 1150 mg del extracto etanólico que se muestra en la **Figura 18**.



Figura 17. Recolección, secado y molido de las partes aéreas de

T. acrodantha



Figura 18. Maceración y filtración de los extractos de las hojas de

T. acrodantha

Tamizaje fitoquímico

Se realizó, la identificación de los grupos de metabolitos secundarios presentes en cada extracto mediante las siguientes pruebas químicas:

Para la determinación de alcaloides se utilizó el ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer, donde se pesó 100 mg del extracto etanólico y se le adicionó 10 mL de HCl al 10 %, luego se colocó el tubo en baño de maría hasta ebullición por 30 minutos, se filtró el contenido del tubo y el filtrado se distribuyó en 3 tubos de ensayo. Posteriormente al filtrado se adicionó a cada tubo gotas del reactivo correspondiente (Dragendorff, Wagner y Mayer). En el caso de los Triterpenos y/o esteroides se empleó el ensayo de (Liebermann-Burchard), donde se procedió a añadir a los extractos 0,5 mL de anhídrido acético a cada uno, luego se le adicionó cuidadosamente por las paredes del tubo unas gotas de ácido sulfúrico concentrado. Para la identificación de las saponinas se empleó la técnica de la espuma, se comenzó colocando en un tubo una pequeña cantidad de cada uno de los extractos y se adicionó 1 mL de agua, se agitó vigorosamente durante un minuto. Los Flavonoides se evaluaron utilizando el ensayo de Shinoda donde se tomó 1 mL de solución de cada extracto, posteriormente se añadieron algunas virutas de Mg, sujetando el tubo con una pinza se añadió cuidadosamente por la pared del tubo unas gotas de HCl concentrado.

En la evaluación de las quinonas se adicionó 2 gotas de hidróxido de amonio concentrado al extracto etanólico en un tubo de ensayo. Las cumarinas se determinaron al adicionar 2 gotas de hidróxido de amonio concentrado al extracto etanólico en tubo de ensayo y se colocó bajo luz UV. Para la identificación de los polifenoles se empleó la prueba con FeCl_3 , se adicionó 1 mL de solución alcohólica de los extractos de hexano y etanólico, luego se le agregó una gota de solución acuosa de cloruro férrico al 10 %.

Evaluación de la actividad antibacteriana

La evaluación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes bajo la supervisión de la Dra. Yndra Cordero, bajo el siguiente procedimiento:

Preparación de las muestras: Se preparó una solución madre a una concentración de 10.000 ppm del extracto etanólico de las hojas de *T. acrodanthe* utilizando como solvente el dimetilsulfóxido (DMSO), el cual sirvió también como control negativo.

Microorganismos evaluados: Para la evaluación de la actividad antibacteriana se determinó mediante el método Kirby Bauer, se estudiaron cinco microorganismos (**Tabla 3**); dos especies de bacterias Gram positivas y tres de Gram negativas de referencia internacional pertenecientes a la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).

Tabla 3. Microorganismos evaluados

Microorganismo	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23357
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212

Activación o enriquecimiento de las cepas bacterianas: para la activación de las cepas se realizó utilizando un medio de agar nutritivo o agar infusión cerebro corazón (BHI) que fue incubadas por 24 horas.

Preparación de agar Mueller-Hinton: Para la preparación del agar Mueller-Hinton (MH), se tomaron 13,3 g del polvo de agar y se disolvieron en 350 mL de agua caliente purificada y se mezcló. Se llevó la solución al microondas hasta que se formó una espuma de más de un 1 cm de grosor, verificando que el agar estuviera transparente lo que indica que el agar se fundió completamente, se llevaron al autoclave por 15 minutos a 121 °C, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se colocó en las placas de Petri previamente estériles.

Preparación de las placas: Se rotularon las placas de petri con el nombre de cada cepa y una placa identificada con el control positivo y control negativo. En cada placa identificada se vertió 15 mL de agar MH, en la placa de controles se colocó la misma cantidad de agar y se dejó solidificar.

Preparación de los inóculos: Se prepararon en solución salina estéril (0,85 % p/v NaCl), a partir del cultivo fresco de cada cepa bacteriana, hasta que se logró una turbidez óptica correspondiente al patrón MacFarland N° 05 (0,5 unidades 10⁸ cel/mL), con la ayuda de un espectrofotómetro se verificó la absorbancia cercana a 580 nm. Una vez preparado el inóculo de cada bacteria, se tomó 1 mL de este inóculo y fue añadido a los medios de cultivo MH de cada placa previamente identificada con cada bacteria. En los medios de controles se inóculo de la misma manera.

Método de difusión en disco Kirby-bauer: se realizó la inoculación de las bacterias sobre la superficie de cada uno de los medios, se tomaron los discos de papel filtro y se impregnaron con 10 uL del extracto etanólico, para los controles positivos se colocaron los antibióticos para las bacterias Gram positivas Eritromicina 15ug (*Staphylococcus aureus*) Ampicilina de 10 ug

(*Enterococcus faecalis*), para las bacterias Gram negativas Piperacilinas 100ug (*Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) y para el control negativo se colocó dimetilsulfóxido (DMSO), se llevó a incubación a 37 °C en oxígeno durante 24 horas.

Lectura de los resultados: Posteriormente se midió el diámetro del halo de inhibición de crecimiento de los controles positivos, donde los halos mayores o iguales a 32 mm (Eritromicina y Ampicilina) y 27 mm (Piperacilina), se consideraron halos de inhibición significativos, de acuerdo con el protocolo establecido por el CLSI, 2023, luego se midieron los halos de inhibición del extracto para cada bacteria, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis fitoquímico de los extractos de las hojas de *T. acrodanthe*

El análisis fitoquímico preliminar de las hojas de *T. acrodanthe* (**Tabla 4**) permitió detectar la presencia de esteroides en el extracto de hexano y de etanol, adicionalmente, este último presentó compuestos fenólicos (**figura 19**).

Tabla 4. Análisis fitoquímico de los extractos de las hojas de *T. acrodanthe*

Metabolitos secundarios	Prueba	Extracto de etanol	Extracto de hexano
Alcaloides	Dragendorff	-	-
	Wagner	-	-
	Mayer	-	-
Esteroides	Liebermann-Burchard	+	++
Terpenos	Liebermann-Burchard	-	-
Compuestos fenólicos Taninos	FeCl ₃	+	-
	Gelatina	-	-
Flavonoides	Shinoda	-	-
Saponinas	Prueba de la espuma	-	-
Cumarinas y Quinonas	Prueba NH ₄ OH	-	-

(++) Abundante. (+) Presente. (-) Ausente

Figura 19. Resultados del análisis fitoquímicos de los extracto de las hojas de *T. acrodantha*



A. Extracto de hexano
B. Extracto de etanol
Esteroles



Extracto de etanol
Compuestos fenólicos

Los resultados obtenidos en el estudio fitoquímico son similares a los reportados por Kofogoue y cols (2022); Soto y cols (2019) sin embargo difieren en varios compuestos determinados en estos estudios como son: alcaloides, taninos, triterpenos, terpenos esteroides, saponinas, catequinas, flavonoides, mientras que los investigadores Raju y cols (2022) determinaron el compuesto bioquímico denominado como ternstroenol F, el cual está ausente en nuestro estudio. También cabe destacar que la katsumadina aislada en los extractos de las flores de *T. pringlei* (Soto y cols 2019) no fue identificada en *T. acrodantha*. Esto podría deberse al hecho, que el trabajo realizado por Kofogoue y Cols, la planta fue recolectada en el continente Africano; Mientras

que Raju y cols, la muestras fueron recolectadas en Australia, Soto y cols, las hojas se obtuvieron en México, donde hay características ambientales diferentes, como luz, temperatura y precipitaciones, diferentes a las de Venezuela que pueden influir en la producción de metabolitos secundarios (Soto, 2019).

Las características de la planta como el contenido de agua, proteínas y metabolitos secundarios generalmente cambian durante la estación de crecimiento y estado de desarrollo de un órgano afirma Valares (2011). Las hojas jóvenes secretan mayor cantidad de flavonoides y diterpenos que los tallos y estos a su vez más que las hojas maduras. Los flavonoides son los compuestos más abundantes, y presentan diferencias significativas entre hojas jóvenes, maduras y tallos (Valares, 2011). Por tanto, la edad de la planta es otro aspecto que pudo haber influido en el aislamiento de los compuestos químicos, identificados en otros trabajos previos.

Actividad antibacteriana de las hojas de *T. acrodanthe*

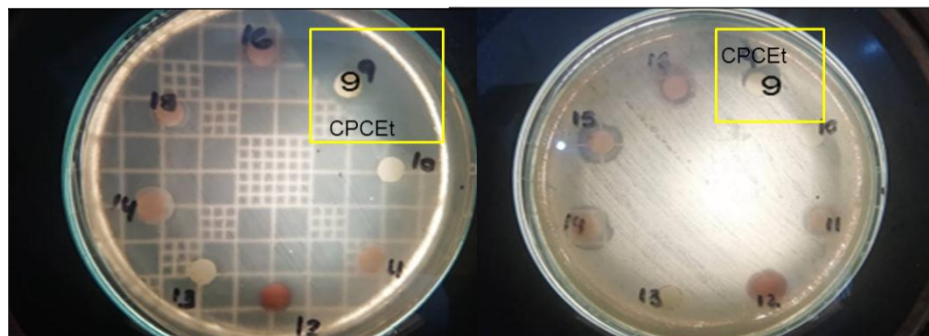
El extracto etanólico de las hojas de *Ternstroemia acrodanthe*, presentó actividad antibacteriana contra las cepas de *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, esto puede deberse a la presencia de los esteroides y compuestos fenólicos en el extracto. En la Tabla 5 y (Figura 20) se muestran los resultados de actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de *Ternstroemia acrodanthe*.

Tabla 5. Resultados de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de *T. acrodanthe*

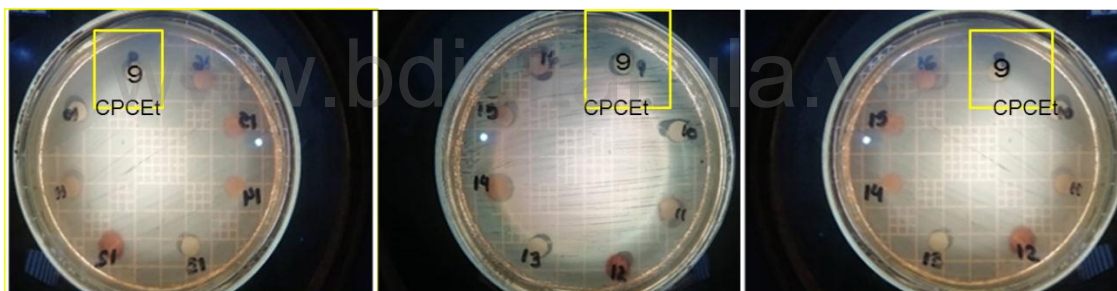
Bacterias	Controles positivos	Halos de inhibición (mm)		
		Controles positivos	Extracto Etanólico	Control Negativo DMSO
<i>S. aureus</i>	Eritromicina 15 ug	32	7	0
<i>E. faecalis</i>	Ampicilina 10 ug	32	9	0
<i>P. aeruginosa</i>	Piperacilinas 100 ug	27	8	0
<i>E. coli</i>	Piperacilinas 100 ug	27	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	Piperacilinas 100 ug	27	12	0

DMSO: dimetilsulfóxido. mm: milímetros

Figura 20. Resultados de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de *T. acrodantha*.



CPCet: Extracto de etanol (9mm) <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	CPCet: Extracto de etanol (7mm) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
--	--



CPCet: Extracto de etanol ausente <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	CPCet: Extracto de etanol (12 mm) <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	CPCet: Extracto de etanol (8 mm) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
--	---	---

El mecanismo de acción de los fitoquímicos está relacionado de forma general con los cambios de la morfología celular que pueden ocasionar destrucción de la membrana que involucra la pérdida de iones, también se puede producir reducción del potencial de la membrana, presentar supresión de los factores de virulencia, inhibición de la síntesis de ácido nucleico, alteración de los perfil de lípidos y disfunción mitocondrial (Prakash; Kumar,

Singh y Songachan, 2020) , por lo que se ha propuesto que los componentes activos de los extractos pueden inhibir el crecimiento de las bacterias mediante los mismos mecanismos con los que actúan los antibióticos (Ordaz; Amas; Yañez; Hernandez; y Camacho, 2010). Los compuestos fenólicos poseen potentes propiedades antibacteriana (Prakash; Kumar, Singh y Songachan, 2020) y estos compuestos pueden estar relacionados con procesos de inhibición enzimática posiblemente por interacciones inespecíficas con las proteínas bacterianas (Romani, Enciso, Cárdenas, Condomuaman.2022) además tienen la capacidad de destruir la pared celular y la membrana celular (Abud, Bustos, Covo y FangMercado. 2015) mientras que los esteroides sirven como percursoros para una gran variedad de productos con actividad específica (hormonas, esteroides), estos también actúan como detergentes de las grasas de la dieta en el intestino para que estas sean más fácilmente accesibles a las lipasas digestivas (Meco, Fuster, Alberich. 2016), por lo que, los compuestos fenólicos presenta actividad antibacteriana. Sin embargo esto podría variar dependiendo de los microorganismos, así como de la estructura química de los metabolitos, y la concentración de los extractos (Vargas y cols, 2014).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- ✓ Se confirmó con respecto a lo determinado con lo anterior con otras especies del género que existe relación entre, los metabolitos identificados (esteroles y polifenoles) con la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *T. acrodanthera*.
- ✓ Los extractos obtenidos mostraron un rendimiento de 600mg y 1150 mg para el etanol y el hexano.
- ✓ En los extractos de etanol y hexano de las hojas de *Ternstroemia acrodanthera*, se determinó la presencia de esteroles y adicionalmente en el extracto de etanol se presentó compuestos fenólicos.
- ✓ El extracto de etanol de las hojas de *T. acrodanthera*, a una concentración de 10,000 ppm mostraron actividad antibacteriana frente a *S. aureus* (7 mm), *E. faecalis* (9 mm), *P. aeruginosa* (8 mm), *K. pneumoniae* (12 mm) y no mostró actividad frente a *E. coli*.
- ✓ Las hojas de *Ternstroemia acrodanthera*, contiene compuestos fenólicos siendo un metabolito de interés, además de una amplia actividad antibacteriana, por lo que se le considera una especie vegetal de interés en la medicina tradicional.
- ✓ La relevancia de la presente investigación se debe a que no existen trabajos previos sobre la composición química y actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Ternstroemia acrodanthera*, siendo este el primer reporte que puede servir de base para futuras investigaciones sobre otras actividades biológicas

RECOMENDACIONES

Evaluar otras actividades biológicas en el extracto de las hojas de *T. acrodantha*, ya que en otros estudios de la misma especie han reportado la presencia de actividad antioxidante, antifúngica y efectos tóxicos.

Determinar la composición química de otras partes de la planta para proporcionar información sobre los componentes químicos de esta especie de *Ternstroemia acrodantha*.

Destacar la necesidad de realizar investigaciones relacionadas con las especies de plantas de nuestros bosques de la cordillera de Mérida los cuales pueden guardar una importante quimio diversidad, la cual sea aprovechable para la salud pública.

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

Abud, K; Bustos, L; Covo, E y FangMercado, L. (2015). Actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos sulfonados en el sistema de conducto radicales. Univerrrsidad de Cartagena. Colombia. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6635370.pdf>.

Aguirre, E; González, M; Pérez, G; Llanos, R. and Guevara, P. (2011). TLC fingerprint profile, antioxidant, and anti-inflammatory effects of aqueous extracts from species of *Cleyer* and *Ternstroemia* genera. Journal of Planar Chromatography 5,400-405.

Ahumada, A; Ortega, A; Chito, D; y Benítez, R. (2016). Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa Willdenow*): un subproducto con alto potencial biológico. Revista Colombiana de Ciencias Químicas Farmacológicas, 45(3), 438-469.

Albornoz, A. (1980). Productos Naturales: Estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas. Caracas, Venezuela: Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.

Aparico, E. (2017). Técnicas colorimétricas. Recuperado: http://Revista.cleu.edu.mx/new/descargas/1703/articulos/Articulos08_Tecnicas_colorimetricas.pdf

Arias, F. (2012). El proyecto de la investigación. Introducción a la metodología científica (6ta edición). Caracas, Venezuela: Editorial Episteme

Ávalos, A. y Pérez-Urria, E. (2009) Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3) ,119-145.

Avila, L.; Baquero, E; Vina,A.; Murillo, E. (2005).Actividad antibacterian *Diphostephium tolimensecuatrec* (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*. Vitae 3(1), 55-60.

Bakht, N; Humaira, F; y Haq, L. (2005). Recent trends and methods in antimicrobial drug discovery from plant sources. Austin Journal of microbiology. 1(1) ,1002.

Medina, A. (2021). Calentamiento por reflujo. Universidad de Guanajuato. México. Recuperado de: <https://www.stuocu.com/es-mmx/document/universidad-de-Guanajuato/química-organica>.

Balderas, J. (2013). Efecto tóxico más que neurofarmacológico de los frutos de *Ternstroemia sylvatica* e identificación del 28-O-[ramnopiranosil]-R1-barriginol como un nuevo compuesto con efecto tóxico en ratones. México. Nacional Library of Medicine. Recuperado de: <http://Pumed.ncbi.nlm.nih.gov>.

Barata, S. y Debenedetti, S. (2007). Identificación de cumarinas en especies autóctonas del género *Pterocaulon* Ell. Buenos Aires, Argentina: Universidad de Belgrano. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/273692784_Identificacion_de_cumarinas_en_especies_autoctonas_del_genero_Pterocaulon_Ell.

Bauer, A; Kirby, W; Sherris, J y Turkck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing bya standardizel single disk method. American Journal of Clinical Pathology, 45(4), 493-496. recuperada de : [http://doi.org/10.1016/SO305-4179\(78\)80006-0](http://doi.org/10.1016/SO305-4179(78)80006-0).

Bessey, C. (1915). The phylogenetic taxonomy of flowering plants. Revista Missouri Botanical Garden. 2: 109-164.

Braude., A; Davis, C y Fierer, J. (1984). Microbiología clínica. Buenos aires. Argentina. Editorial Panamericana

Burgess, J; Jordan, E; Bregus, M; Mearns, A; y Boyd, k. (1999). Microbial antagonism a neglected avenue of natural products resear. Journal of Biotechnology, 70(1), 27-32 recuperado de: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00054-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00054-1)

Bruneton, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquímica-Plantas medicinales. Zaragoza, España: Editorial Acribia.

Cano A. L. (1997). Flora Medicinal de Veracruz. I. Inventario etnobotánico. 1ª Edición: 324-325.

Sharapin, N. 2000. Materias primas vegetales para la industria de productos fitoterapéuticos. En: Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Bogotá, Convenio Andrés Bello

Clarence, E. (1942). Studies in the Theaceae XII: Notes on the south American species of *Ternstroemia*.

Claudia, M. (2013). Estudio biodirigido de la actividad antiinflamatoria y antioxidante de *Ternstroemia sylvatica*. (Tesis de maestría). Universidad veracruzana, Xalapa, Veracruz.

Correa, A; De La Cadena, E; Rojas, R; Falco, A; Aranaga, C; Alonso, G y Perenguez, M. (2021). Resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos. Santiago de Cali: editorial USC, 2021, PP.11-34. Recuperado de: <https://books.scielo.org/id/t755k>.

Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clínica microbiologyreviews, 12(4), 564-82. Recuperado de: <http://doi.org/10.1128/0893-8512.99.4.00100>.

Cronquist A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press.

Cruz, J. (2021). Plantas medicinales. Recuperado de: <https://infonortedigital.com/archive/147540/plantas-medicinales-mocan>.

Domínguez, X. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. México, D.F: Editorial Limusa, S.A.

Escamilla, C. Cuevas, E. y Guevara, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Revista Facultad Médica UNAM, 52(2), 73-75. Recuperado de: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-2/RFM052000207.pdf>.

Estrada, R; Ubaldo, D; y Araujo, A. (2012). Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. Salud Mental 35 (5), 375-384. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/sm/v35n5/v35n5a4.pdf>

Fernández P. (1987). Guía práctica de plantas medicinales. 4000 recetas para 600 enfermedades. Editorial Omega, S. A. Barcelona España, p. 406.

Forbes, B. Sahm, D. y Weissfeld, A. (2009). Diagnóstico microbiológico. Buenos Aires: Editorial. Médica Panamericana.

Flores, V; Castañeda, O; Montiel, T y Hernández, G. (2014). Análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Hemiphyllacus novogalicianus*, una especie endémica de México. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. 22(63), 18-23. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/html/674/67435407003/>

Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. Acta biol. Colomb., 13(3), 27-36. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v13n3/v13n3a2.pdf>.

Germosén-Robineau L. 1996. Farmacopea Caribeña. Enda-Caribe TRAMIL.

Gil, M; Perelli, A; Alvarado, R; Arias, Y; y Blumenthal, E. (2012). Actividad antibartecriostatica y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas.

Recuperado de:
<http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-701613>

Gutiérrez, A. y Estévez, A. (2009). Relevancia de los Productos Naturales en el Descubrimiento de Nuevos Fármacos en el S. XXI. Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Esp) 103 (2), 409-419. Recuperado de: <http://www.rac.es/ficheros/doc/00899.pdf>.

Guzmán S. L., Reyes R. y Bonilla H. (2014). Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. Revista Brazilian journal of pharmacognosy 24, 591-608.

Hernández, R; Fernández, C y Bastidas, P. (2010). Metodología de la Investigación (5ta edición). México. D.F. Editorial McGrawHil

Hurtado, J. (2010). El Proyecto de Investigación. Caracas, Venezuela: Quirón Ediciones.

Jarvis, W. (1996). The epidemiology of colonization. Infection Control & Hospital Epidemiology. 17(1), 47-52.

Jiménez C. y Riguera R. (1994). Phenylethanoid glycosides in plants: structure and biological activity. Revista Natural Product Reports 11, 591-606.

Jo, Y; Suh, J; Shin, M; Jung, J; y Im, K. (2005). Jacaranone and related compounds from the fresh fruits of *Ternstroemia japonica* and their antioxidative activity. Revista Archives of Pharmacal Research 28, 885-888.

Kofogoue, A; Tchinda, C; Mbaveng, A; y Kuete, V. (2022) Antibacterial and antibiotic-potentiating actives of *Desmodium uncinatum*, *Neonoutonia glabrescens*, *Ternstroemia cameroonensis* and eight other Cameroonian plants against multi-drug resistant bacteria expressing active efflux pumps. Cameroon. Africa. Investigational Medicinal Chemistry & Pharmacology. Recuperado de: <http://www.ajol.info/index.php/impc/article/view/242259>

Lawrence G. M. (1951). Taxonomy of Vascular Plants. Macmillan, New York.

Luna, I y Ochoterana, H. (2004). Phylogenetic relationships of the genera of *Theaceae* based on morphology. Cladistics. 20: 223-270

Marcano, D y Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica orgánica. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela.

Martínez, A. (2020). Química de Productos Naturales. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia, pág 52-54.

Martínez, A. Valencia, G., Jiménez, N., y Galeano, M. (2008). Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.

Martínez, M. (2002). La nueva ciencia: su desafío, lógica y método. Ciudad de México: Trillas.

Meco, J; Fuster, V; Alberich, R. (2016). La utilización de los esteroides vegetales en la práctica clínica. Clínica e Investigación en Arteriosclerosis. Vol. 8. Pág 283-294

Moreno, Cl. (2013). Estudio biodirigido de la actividad antiinflamatoria y antioxidante de *Ternstroemia sylvatica*. Vera cruz. Mexico. Universidad Veracruz. Recuperado de: <http://cdigital.uv.mx/handle.23456789/46856.pdf>.

Moreno, C; Sanchez, A; Vazquez, M; Hernandez, A y Garcia, R. (2019). Antioxidant, anti-inflammatory and anticonceptive potencial of *Ternstroemia sylvatica* Schltdl. & Cham. Pacific Journal of Tropical Medicine. 1-7

Murray, P; Rosenthal, k y Pfaller, M. (2009). Microbiología Médica. Barcelona. España.

Nacimiento, G; Locatelli, J; Freitas, P; Silva, G. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals o antibiotic resistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiology. 31:247-256. recuperado de: <http://www.scielo.org.co/br/j/bjm/a/tlgk495rVLgtNJgG9z755sR//?/ang=en>

Ordaz, G; Amas, H; Yañez, D; Hernandez, J; y Camacho, A. (2010). Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de los extractos de tres corales y tres moluscos marinos de Sucre, Venezuela. Revista de Biología Tropical. 58(2): 677-688. ISSN-0034-7744. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-61322018000100014.

Organización Mundial de la Salud (OMS), (2001). Estrategia to contain resistance to antimicrobial drugs. Revista. Panamá. Salud publica, 10(4), 284-294. Recuperado de: <http://WWW.who.int/es>

Palacios, M. (2015). Farmaconognosia y fitoquímica tf. Universidad católica Los Angeles de Chimbote. Recuperado de http://issuu.com/leono/docs/farmacognosia_y_fitoqu_mica_tf/48

Prats, B; Kumar, A; Singh, P; Songachan, L. (2005). Propiedades antibacterianas y antioxidante de fitoquímicos: estado actual y perspectiva

futura. Centro de estudio avanzado en botánica, Instituto de ciencias, Banaras Hindu University, Varanasis, Uttar Pradesh, India.

Pérez, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Revista Cubana Investigación Biomedica, 22(1), 48-57. Recuperado de: http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22_1_03/ibi07103.pdf.

Raju R, Shintu M; Reddell, P y Munch G. (2022). Ternstroenol F: una nueva saponina de triterpenoide de pentacíclico aislado de la planta de la selva Australiana *Ternstroemia cherry*. Recuperado de: <https://doi.org/10.1080/1478419.2022.2039139>.

Ramirez, I y Marin, D. (2009). Metodología para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuesto de origen vegetal. Sáentiael Tebnica, 42, 263-268.

Ramírez, R. (2015). Técnicas Básicas de Microbiología y su Fundamento. México D.F. Editorial Trillas.

Rivas, C., Oranday, y Verde, M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. Nuevo León, México: OmniaScience.

Rodriguez, J. (2005). Mecanismo de resistencia a quinolonas mediadas por plásmidos. Revista Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica 23(1), 25-31. Recuperado de: <https://es.khanacademy.org>.

Romani, L; Enciso, E; Cardenas, V; Condomuaman, Y. (2022). Actividad antibacteriana de compuestos fenólicos de semillas de *Persea americana* Mill. “palta has” frente a *Escherichia coli*. Universidad Nacional de san cristobal de Huamanga, Facultad de ciencias de la salud. Perú. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/344764065_Actividad_antibacteriana_de_compuestos_fenolicos

Sharapin, N. (2000). Materias primas vegetales para la industria de productos fitoterapéuticos. En: Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Bogotá, Convenio Andrés Bello

Soto, U. (2019). Análisis de la variación bimestral del perfil metabólico de *Ternstroemia pringei*. Morelos, México: Universidad autónoma del estado de Morelos. Recuperado de: <http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.5000.12055/1991/SODAZL06T.pdf>

Steyermark, J. (1952). Contributions of the flora of Venezuela. Chicago. Estados Unidos, natural history museum volumen 28, número 2, página 381.

Torres, C. (2004). Investigación en la transformación secundaria de frutos, tubérculos, flores, hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Informe técnico. Bogotá, Colombia: Jardín Botánico José Celestino Mutis-Subdirección científica.

Tábío, D; Díaz, Y; Rondón, M; Fernández, E; y Piloto, R. (2017). Extracción de aceites de origen vegetal. Universidad de Aguascaliente, 26 (74), 1-4. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/317007345_Extraccion_de_aceites_de_origen_vegetal

Taroco, R., Seija, V., y Vignoli, R. (2006). Temas de Bacteriología y Virología Médica. Montevideo, Uruguay: Femur.

Tuñón, M. (2002) Criterios de armonía funcional entre gastronomía y salud. Nutrición hospitalaria. 4: 75-84. Recuperado de: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338>.

Uchil, R; Singh, G; Vijay M. (2014). Estrategia para combatir la resistencia a los antimicrobianos. Nacional library of medicine, 8 (7, MEO1-MEO4.doi:10.7860/JCDR/2014/8925.4529.

Valares, C. (2011). Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Badajoz Universidad de Extremadura.

Valcárcel, M., y Gómez, A. (1988). Técnicas analíticas de separación (1ª edición). Barcelona, España: Editorial Reverte.

Vargas, R; Torrescano, G; Mendoza, A; Vallejo, B; Sanchez, J; Peñalba, M; y Sanchez, A. (2014). Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antimicrobiana del Propóleos. Rev. Biotecnología, Vol (XVI), Núm. (1). Recuperado de: [http:// www.biotecnologia.uson.mx](http://www.biotecnologia.uson.mx)

Virgin, AW. (2007). Pathogenesis of infection as it actually happens. Nat Immunol/2007; 8(11), 1143-1147.

Vivot, E; Sánchez, C. (2012). Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre ríos (Argentina). Recuperado de: <http://www.Scielo.org.ar>

Yosioka, I; Takeda R; Matsuda, A. and Kitagawa, A. (1971). Sapogenol constituents of seeds of *Camellia sasanqua* Thunb and leaves of *Ternstroemia japonica* Thunb. Revista Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 20, 1237-1242.